

# **Mechanismen der Übertragung von mütterlichem Stress auf den Feten**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Michelle Dreiling (geb. Haase)

geboren am 15.12.1989 in Karl-Marx-Stadt.

**Gutachter** (*akademischer Grad, Vor- und Nachname sowie Wirkungsort*)

**1. Prof. Dr. Matthias Schwab, Jena**

**2. PD Dr. Uwe Schneider, Jena**

**3. PD Dr. Dr. Yves Garnier, Osnabrück**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.04.2016**

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>1 Zusammenfassung .....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>2 Einleitung.....</b>  | <b>9</b>  |
| 2.1 Bedeutung von Stress während der Schwangerschaft .....  | 9         |
| 2.2 Das Konzept der fetalen Programmierung .....  | 10        |
| 2.3 Programmierende Effekte von pränatalem Stress auf die fetale Entwicklung<br>und auf Krankheiten im späteren Leben ..... | 11        |
| 2.3.1 Programmierung der fetalen Stressachse.....   | 11        |
| 2.3.1.1 Funktionsweise der Stressachse .....  | 11        |
| 2.3.1.2 Die Entwicklung der Stressachse .....   | 12        |
| 2.3.1.3 Vulnerable Phasen der Entwicklung der fetalen HHN-Achse .....   | 18        |
| 2.3.2 Effekte auf das Wachstum.....   | 19        |
| 2.3.3 Programmierung von Organfunktionen .....  | 20        |
| 2.3.3.1 Das kardiovaskuläre System .....  | 21        |
| 2.3.3.2 Das metabolische System .....   | 22        |
| 2.3.3.3 Das zentrale Nervensystem .....   | 23        |
| 2.4 Übertragung von pränatalem mütterlichem Stress auf den Feten.....   | 26        |
| 2.4.1 Plazentarer Transfer von Stresshormonen .....   | 26        |
| 2.4.1.1 Kortisol .....  | 26        |
| 2.4.1.2 Katecholamine .....   | 27        |
| <b>3 Ziele der Arbeit.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>4 Material und Methoden .....</b>  | <b>30</b> |
| 4.1 Allgemeiner Versuchsüberblick.....  | 30        |
| 4.2 Versuchsabschnitt A .....   | 31        |
| 4.2.1 Terminierte Verpaarung.....   | 31        |
| 4.3 Versuchsabschnitt B .....   | 32        |
| 4.3.1 Operative Instrumentierung .....  | 32        |
| 4.3.2 Protokoll zum akuten Isolationsversuch.....   | 34        |
| 4.3.2.1 Nativer Isolationsversuch .....   | 34        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.3.2.2  | <i>Isolationsversuche unter sympathoadrener Blockade</i> .....  | 35        |
| 4.4      | Kortisol- und Katecholaminbestimmung .....  | 36        |
| 4.5      | Statistische Analysen .....   | 37        |
| <b>5</b> | <b>Ergebnisse</b> .....   | <b>38</b> |
| 5.1      | Akute mütterliche Stressantwort .....   | 38        |
| 5.1.1    | Stresshormone der Muttertiere während der Isolation .....   | 38        |
| 5.1.2    | Blutgase und metabolische Parameter der Muttertiere während der Isolation .....   | 39        |
| 5.1.3    | Kardiovaskuläre Parameter der Muttertiere während der Isolation.....  | 41        |
| 5.1.4    | Uteriner Blutfluss während der Isolation .....  | 41        |
| 5.2      | Akute fetale Stressantwort .....  | 42        |
| 5.2.1    | Stresshormone der Feten während der Isolation .....   | 42        |
| 5.2.2    | Blutgase und metabolische Parameter der Feten während der Isolation .....   | 43        |
| 5.2.3    | Kardiovaskuläre Parameter der Feten während der Isolation .....   | 45        |
| 5.3      | Effekte einer kombinierten $\alpha_1$ - und $\beta_{1,2}$ -Adrenorezeptorblockade mittels<br>Labetalol auf die Stressantwort der Muttertiere..... | 46        |
| 5.3.1    | Blutgase und metabolische Parameter der Muttertiere während der Labetalolgabe<br>und der nachfolgenden Isolation.....                             | 46        |
| 5.3.2    | Kardiovaskuläre Parameter der Muttertiere während der Labetalolgabe und der<br>nachfolgenden Isolation.....                                       | 47        |
| 5.3.3    | Uteriner Blutfluss während der Labetalolgabe und der nachfolgenden Isolation ...  | 47        |
| 5.4      | Effekte einer $\alpha_1$ -Adrenorezeptorblockade mittels Urapidil auf die Stressantwort<br>der Muttertiere.....                                   | 49        |
| 5.4.1    | Blutgase und metabolische Parameter der Muttertiere während der Urapidilgabe<br>und der nachfolgenden Isolation.....                              | 49        |
| 5.4.2    | Kardiovaskuläre Parameter der Muttertiere während der Urapidilgabe und der<br>nachfolgenden Isolation.....  | 49        |
| 5.4.3    | Uteriner Blutfluss während der Urapidilgabe und der nachfolgenden Isolation.....  | 50        |
| <b>6</b> | <b>Diskussion</b> .....   | <b>51</b> |
| 6.1      | Diskussion der Methodik .....   | 51        |
| 6.1.1    | Das „fetale Schaf“ als tierexperimentelles Modell .....   | 51        |
| 6.1.2    | Chirurgische Instrumentierung.....  | 51        |
| 6.1.3    | Akute Isolationsversuche.....   | 52        |

|               |  |           |
|---------------|--|-----------|
| 6.1.4         | Ableitung der auszuwertenden Parameter .....   | 53        |
| 6.2           | Diskussion der Ergebnisse .....  | 54        |
| 6.2.1         | Akute mütterliche Stressantwort .....  | 54        |
| 6.2.1.1       | <i>Stresshormone der Muttertiere während der Isolation .....</i>   | <i>54</i> |
| 6.2.1.2       | <i>Blutgase und metabolische Parameter der Muttertiere während der Isolation .....</i>   | <i>54</i> |
| 6.2.1.3       | <i>Kardiovaskuläre Parameter der Muttertiere und uteriner Blutfluss während der Isolation.....</i>   | <i>55</i> |
| 6.2.2         | Akute fetale Stressantwort.....  | 56        |
| 6.2.2.1       | <i>Stresshormone der Feten während der Isolation .....</i>   | <i>56</i> |
| 6.2.2.2       | <i>Blutgase und metabolische Parameter der Feten während der Isolation .....</i>   | <i>58</i> |
| 6.2.2.3       | <i>Kardiovaskuläre Parameter der Feten während der Isolation .....</i>   | <i>60</i> |
| 6.2.3         | Effekte einer kombinierten $\alpha_1$ - und $\beta_{1,2}$ -Adrenorezeptorblockade mittels Labetalol auf die mütterliche Stressantwort..... | 61        |
| 6.2.3.1       | <i>Blutgase und metabolische Parameter der Muttertiere während der Labetalolgabe und der nachfolgenden Isolation .....</i>                 | <i>61</i> |
| 6.2.3.2       | <i>Kardiovaskuläre Parameter der Muttertiere und uteriner Blutfluss während der Labetalolgabe und der nachfolgenden Isolation .....</i>    | <i>62</i> |
| 6.2.4         | Effekte einer $\alpha_1$ -Adrenorezeptorblockade mittels Urapidil auf die mütterliche Stressantwort .....                                  | 64        |
| 6.2.4.1       | <i>Blutgase und metabolische Parameter der Muttertiere während der Urapidilgabe und der nachfolgenden Isolation.....</i>                   | <i>64</i> |
| 6.2.4.2       | <i>Kardiovaskuläre Parameter der Muttertiere und uteriner Blutfluss während der Urapidilgabe und der nachfolgenden Isolation.....</i>      | <i>64</i> |
| <b>7</b>      | <b>Schlussfolgerung.....</b>   | <b>66</b> |
| <b>8</b>      | <b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>   | <b>68</b> |
| <b>Anhang</b> | <b>.....</b>   | <b>79</b> |
|               | Ehrenwörtliche Erklärung .....   | 79        |
|               | Tabellarischer Lebenslauf .....  | 80        |
|               | Danksagung.....  | 81        |

## Abkürzungsverzeichnis

|                  |   |
|------------------|---|
| 11 $\beta$ -HSD  | 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase        |
| ACTH             | adrenokortikotropes Hormon                      |
| AVP              | Arginin-Vasopressin                             |
| CRH              | Kortikotropin-Releasing-Hormon                  |
| h                | Stunde  |
| HHN-Achse        | Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse |
| i.v.             | intravenös                                      |
| IGF              | Insuline-like Growth Faktor                     |
| kg               | Kilogramm                                       |
| KG               | Körpergewicht                                   |
| mg               | Milligramm                                      |
| n                | Anzahl der Tiere                                |
| pCO <sub>2</sub> | Kohlenstoffdioxidpartialdruck                   |
| PEPCK            | Phosphoenolpyruvat-Karboxykinase                |
| pO <sub>2</sub>  | Sauerstoffpartialdruck                          |
| RIA              | Radioimmunassay                                 |
| sO <sub>2</sub>  | Sauerstoffsättigung                             |
| SSW              | Schwangerschaftswoche                           |
| UBF              | uteriner Blutfluss                              |
| Vgl.             | Vergleich                                       |

# 1 Zusammenfassung

Stress stellt in der heutigen Zeit und damit auch während der Schwangerschaft ein stetig zunehmendes Problem dar. Das ungeborene Kind wird dabei von mütterlichem Stress in unterschiedlicher Art und Weise betroffen. In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass psychischer Stress oder die Gabe von synthetischen Glukokortikoiden mit einer erhöhten Inzidenz von neuropsychiatrischen, kardiovaskulären und endokrinen Erkrankungen einhergehen. Zudem kann das Geburtsgewicht von Kindern gestresster Mütter teilweise drastisch vermindert sein. Die Ursache liegt in einer durch Stress induzierten Programmierung von Organfunktionen, wie z.B. dem Gehirn mit der fetalen Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse), um den Feten bestmöglich auf die zu erwartende Umwelt anzupassen. Damit kann beispielsweise die Hirnentwicklung gestört werden oder eine dauerhaft erhöhte Aktivität der fetalen HHN-Achse programmiert werden, welche im späteren Leben unter anderem zu neuropsychiatrischen Auffälligkeiten führen kann.

Da Katecholamine im Gegensatz zu Kortisol nicht plazentagängig sind, wurde bisher angenommen, dass die Übertragung von mütterlichem Stress auf den Feten alleinig über Kortisol vermittelt wird. Neuropsychologische Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass insbesondere Stress während der frühen Schwangerschaft starke Effekte auf den Feten hat (Bzoskie et al. 1995). Dies ist insbesondere deshalb interessant, weil die fetalen Glukokortikoidrezeptoren erst in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft nachweisbar sind (Brodhun M et al. 2003, Noorlander et al. 2006).

Es war daher das Anliegen der vorliegenden Arbeit zu klären, ob mütterlicher Stress auch unabhängig von Kortisol auf den Feten übertragen werden kann. Wir stellten die Hypothese auf, dass mütterlicher Stress auch indirekt über eine Katecholamin-vermittelte uterine Vasokonstriktion und einem konsekutivem Abfall des uterinen Blutflusses (UBF), auf den Feten übertragen wird. Die daraus resultierende plazentare Minderperfusion könnte Stress für den Feten bedeuten und seine Stoffwechselsituation negativ beeinflussen.

Wir führten unsere Untersuchungen am chronisch instrumentierten fetalen Schaf, dem wichtigsten Modell der Fetalphysiologie, durch. Zur Überprüfung der Effekte von akutem mütterlichem Stress auf den Feten wurden chronisch instrumentierte trächtige

Schafe einem akuten Isolationsstress, welcher einen artgerechten Stressor für Herdentiere darstellt, ausgesetzt. Es erfolgte die Aufzeichnung der mütterlichen und der fetalen Stressantwort mit Blutdruck, Herzfrequenz, UBF, Blutgasen, metabolischen Parametern, sowie Katecholamin- und Kortisolspiegeln. Um zu überprüfen, ob die uterine Vasokonstriktion metabolische Effekte hat, wurden die akuten Isolationsversuche nicht nur zum frühestmöglichen Zeitpunkt einer chronischen Instrumentierung (0,73 der Gestationsdauer) des Feten, sondern auch in der Phase des größten exponentiellen Wachstums (0,86 der Gestationsdauer) durchgeführt.

Während des akuten Isolationsstresses kam es zu einer signifikanten Verminderung des UBF. Bei denjenigen Feten, welche sich in der Phase des exponentiellen Wachstums befanden (0,86 Gestationsdauer) war diese Verminderung in besonderem Maße mit einer Verschiebung der Stoffwechsellage in Richtung einer anaeroben Stoffwechselsituation verbunden.

Zur Klärung inwieweit Katecholamine für den stressbedingten Abfall der uterinen Durchblutung verantwortlich sind, wurden die akuten Stressversuche unter sympathoadrenerger Blockade mit Labetalol, einem kombinierten  $\alpha_1$ - und  $\beta_{1,2}$ -Adrenorezeptor-Antagonisten sowie Urapidil, einem  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor-Antagonisten, wiederholt.

Unter sympathoadrenerger Blockade blieb der Abfall des UBF sowohl unter Labetalol als auch unter Urapidil aus. Dies beweist, dass der UBF-Abfall über eine Katecholamin-bedingte,  $\alpha_1$ -vermittelte Vasokonstriktion im uterinen Gefäßbett hervorgerufen wird.

Diese Arbeit zeigt, dass mütterlicher Stress nicht nur über Kortisol sondern auch indirekt über eine Katecholamin-vermittelte Reduktion des UBF auf den Feten übertragen wird. Dieser Mechanismus führt zu einer prolongierten Umstellung des fetalen Stoffwechsels in Richtung einer anaeroben Stoffwechselsituation, die v.a. während des exponentiellen Wachstums in der späten Schwangerschaft sichtbar wird. Die stressassoziierte fetale Minderversorgung trägt möglicherweise zu der unter pränatalem Stress und pränataler Glukokortikoidgabe beobachteten fetalen Wachstumsverminderung bei.



## 2 Einleitung

### 2.1 Bedeutung von Stress während der Schwangerschaft

In der Literatur finden sich viele unterschiedliche Stresskonzepte, was den unterschiedlichen – z.B. medizinischen, psychologischen und philosophischen – Sichtweisen geschuldet ist. Allen gemein ist jedoch, dass Stress als eine unspezifische Reaktion des Körpers auf eine unterschiedlich geartete Belastung definiert wird (Selye 1974). Unter Belastung versteht man im Allgemeinen die Anpassung des Individuums an neue Gegebenheiten in seiner Umwelt. Dabei kann Stress einerseits physisch durch körperliche Anstrengung oder Krankheit, andererseits psychisch durch Leistungsdruck oder den Verlust eines Angehörigen in Erscheinung treten. Dabei bewirken ähnliche Stresssituationen bei verschiedenen Individuen ein unterschiedliches Stressempfinden (Lazarus 1991, Lazarus 1999). Die Effekte von Stress können in Abhängigkeit vom Stressor sowohl positiv, im Sinne einer gesteigerten Leistungsfähigkeit, als auch negativ, im Sinne einer Arbeitsunfähigkeit wie bei einem „Burn-out-Syndrom“, sein. Insbesondere wenn die Anpassung an neue Gegebenheiten länger dauert oder schwieriger ist als erwartet, entsteht negativer Stress.

Besonders während der Schwangerschaft kann physischer und psychischer Stress nicht nur die werdende Mutter sondern auch das Baby im Mutterleib vor besondere Herausforderungen stellen, welche das spätere Leben des Kindes maßgeblich prägen können (Harris und Seckl 2011, Mulder et al. 2002). Die Erforschung der Effekte und der Übertragungswege von mütterlichem Stress auf den Feten befinden sich derzeit noch am Anfang und sind nur wenig untersucht. Vor dem Hintergrund dieser Ungewissheit existieren in vielen Ländern Gesetze zum Schutz der Mutter und des Feten. In Deutschland entspricht dies dem sogenannten Mutterschutzgesetz (BmFSFJ 2011). Die Schwangere wird vom Arbeitgeber vor Stress geschützt, indem sie über die gesamte Schwangerschaft von Schicht- und Nachtarbeit befreit wird. Außerdem besteht ein Schutz gegenüber Infektionen, wobei eine im Gesundheitswesen beschäftigte Schwangere nicht mit infektiösem Material arbeiten darf. Die vollständige Entlastung von zumindest beruflichem Stress geschieht jedoch erst während der letzten sechs Wochen vor der Entbindung, wenn der Schwangeren ein Beschäftigungsverbot erteilt wird.

Was ist jedoch mit psychischem Stress vor dem Beschäftigungsverbot oder Stress unabhängig von der Arbeit in Form von Ängsten und Sorgen z.B. vor einer Behinderung des Kindes, Stress durch Naturkatastrophen, Kriegserlebnisse oder den Verlust eines Familienmitgliedes? Für diese Arten von Stress existieren keine Schutzmaßnahmen. Im Gegenteil: Er bricht oft unvorhersehbar und unvermeidlich auf die Schwangere herein.

Chronischer Stress während der Schwangerschaft wirkt sich nicht nur auf die Mutter sondern auch auf das Kind nachweislich aus. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass mütterlicher Stress während der Schwangerschaft auf den Feten übertragen wird und neben pränatalen Effekten auch adverse Effekte auf das spätere Leben des Kindes hat. Diesen Prozess nennt man fetale Programmierung (Schwab 2009, Gicquel et al. 2008).

## 2.2 Das Konzept der fetalen Programmierung

Im Rahmen der klassischen Krankheitslehre wird angenommen, dass verbreitete Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, arterieller Hypertonus oder Depression multifaktoriell vererbt werden. Dies bedeutet, dass neben einer genetischen Prädisposition auch exogene Faktoren für das Entstehen einer Erkrankung verantwortlich sind. Nachdem anfänglich vor allem den postnatalen Einflüssen eine große Rolle zugeschrieben wurde, gewannen in den vergangenen 20 Jahren auch pränatale Faktoren an Bedeutung. Heute geht man davon aus, dass bestimmte Einflussfaktoren in kritischen Phasen der fetalen Entwicklung über eine Änderung der Genregulation und -expression die physiologische Reifung von Organsystemen beeinflussen (Gicquel et al. 2008, Meaney und Szyf 2005, Sloboda et al. 2008). Besonders vulnerable Organsysteme sind diejenigen, welche über ein hohes Maß an Plastizität verfügen, wie z.B. das Verdauungssystem, das kardiovaskuläre System oder das zentrale Nervensystem (Schwab 2009). Der evolutionsbiologische Sinn jener Veränderungen besteht in einer möglichst optimalen intrauterinen Adaptation an die bevorstehenden, zu erwartenden Umweltbedingungen z.B. im Sinne eines geringen Nahrungsangebotes (Schwab 2009). Dieses Anpassungsphänomen wird als „fetale Programmierung“ bezeichnet. Bleiben die erwarteten Umweltbedingungen allerdings aus, ist demnach beispielsweise genügend Nahrung vorhanden, so erlangen die

irreversiblen intrauterinen Veränderungen eine pathogenetische Bedeutung im Hinblick auf die Entstehung von Krankheiten (Schwab 2009).

Gegen Ende des 20. Jahrhunderts sah der britische Epidemiologe J. D. Barker einen Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und der Mortalität durch die ischämische Herzkrankheit (Barker et al. 1989). Dieser Zusammenhang warf die Frage auf, inwieweit Umwelteinflüsse als epigenetische Faktoren bereits pränatal einen Einfluss auf die Entstehung von Krankheiten im späteren Leben haben. Hinsichtlich dieser Fragestellung wurden seither weltweit zahlreiche epidemiologische und experimentelle Studien durchgeführt (Harris und Seckl 2011, Welberg und Seckl 2001, Xiong und Zhang 2013). Einen möglichen programmierenden Faktor stellt eine Mangelernährung des Feten durch plazentare Insuffizienz oder Unterernährung der Mutter dar. Aber auch erhöhte fetale Stresshormonspiegel, welche durch die Übertragung mütterlichen psychischen Stresses oder durch exogene Glukokortikoide verursacht werden, können einen programmierenden Effekt haben (Kapoor et al. 2008).

## 2.3 Programmierende Effekte von pränatalem Stress auf die fetale Entwicklung und auf Krankheiten im späteren Leben

### 2.3.1 Programmierung der fetalen Stressachse

#### 2.3.1.1 Funktionsweise der Stressachse

Wird ein Individuum einem Stressor ausgesetzt, so folgt im Rahmen der Stressreaktion die Aktivierung der Stressachse mit ihren beiden Armen: dem schnell verfügbaren katecholaminergen System sowie der etwas verzögert aktivierten HHN-Achse (Niezgoda et al. 1993).

Bei der Aktivierung des katecholaminergen Systems kommt es zu einer schnellen Stressantwort durch die periphere Freisetzung von Katecholaminen in den Blutkreislauf. Diese erfolgt hierbei aus drei verschiedenen Komponenten des katecholaminergen Systems: dem sympatho-adrenomedullären System, dem sympatho-neuronalen System und dem DOPA-dopaminergen parakrinen System (Kvetnansky et al. 2009).

Die Reaktion der HHN-Achse beginnt mit der Ausschüttung von Kortikotropin-Releasing-Hormon (CRH) und Arginin-Vasopressin (AVP) aus dem Nucleus paraventricularis des Hypothalamus (Xiong und Zhang 2013). Beide Hormone fördern die Produktion und Freisetzung des adrenokortikotropen Hormons (ACTH) der Adenohypophyse (Evans et al. 1985). ACTH gelangt in den Blutkreislauf und stimuliert die Freisetzung von Glukokortikoiden aus der Nebennierenrinde (Mesiano und Jaffe 1997). Über die Bindung der Glukokortikoide an die ubiquitär vorhandenen Mineralokortikoid- und Glukokortikoidrezeptoren wird eine synergistische Stressantwort aller Organsysteme ausgelöst (Xiong und Zhang 2013). Die HHN-Achse unterliegt wiederum einem negativen Feedbackmechanismus über Glukokortikoidrezeptoren im Hippocampus, in der Hypophyse sowie im Hypothalamus, wodurch die steigende Konzentration von Glukokortikoiden die Ausschüttung von CRH hemmt (Papadimitriou und Priftis 2009).

### 2.3.1.2 Die Entwicklung der Stressachse

Wesentliche Untersuchungen zur Reifung der Stressachse stammen vom Schaf. Die Hirnentwicklung und insbesondere die Entwicklung der HHN-Achse findet beim fetalen Schaf, ebenso wie beim Menschen, perinatal statt (Kapoor et al. 2006, Challis und Brooks 1989). Auch die Reifung des autonomen Nervensystems und die neuroendokrine Entwicklung geschieht, ähnlich wie beim Menschen, perinatal (Weinstock 2008, Xiong und Zhang 2013). Dadurch ist das fetale Schaf ein ideales Vergleichsmodell zum Menschen.

#### *a. Die Entwicklung der HHN-Achse*

Die HHN-Achse besteht aus dem Hypothalamus, der Hypophyse, der Nebennierenrinde sowie den Mineralo- und Glukokortikoidrezeptoren (siehe 2.3.1.1). Die Funktion der einzelnen Komponenten der fetalen HHN-Achse entwickelt sich über den gesamten Schwangerschaftsverlauf (Challis und Brooks 1989, Bolt et al. 2002). Beginnend mit dem Hypothalamus konnten beim Menschen bioaktives CRH sowie weitere ACTH-freisetzende Substanzen wie AVP ab der 12. Schwangerschaftswoche (SSW) (0.32 Gestationsdauer) nachgewiesen werden (Ackland et al. 1986). Tierexperimentell wurde das Vorhandensein von bioaktivem CRH und AVP im Hypothalamus des fetalen Schafes ab dem 63. Gestationstag (0.42 Gestationsdauer) gezeigt (Currie und Brooks 1992, Brieu et al. 1989). Insbesondere AVP-Neurone

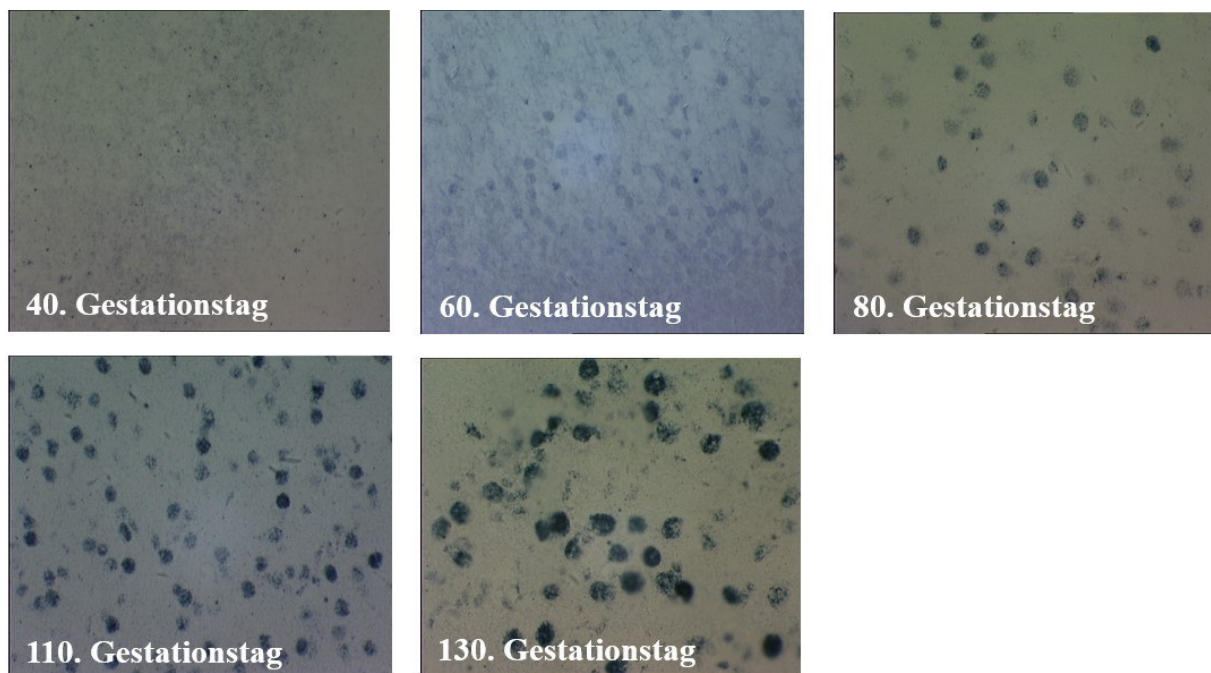
wurden im Hypothalamus des fetalen Schafes schon am 42. Gestationstag (0.28 Gestationsdauer) nachgewiesen (Levidiotis et al. 1987). Daher scheint sowohl beim Menschen als auch beim fetalen Schaf in erster Linie AVP für die Freisetzung von ACTH v.a. in der frühen Schwangerschaft verantwortlich zu sein (Levidiotis et al. 1987, Familiari et al. 1989, Gillies et al. 1982, Challis und Brooks 1989).

In der Tat ist die menschliche Hypophyse bereits in der 10. SSW (0.26 Gestationsdauer) in der Lage, auf eine externe CRH-Stimulation in vitro mit einer ACTH-Ausschüttung zumindest in geringen Mengen zu reagieren (Gyevai 1980). Das Vorhandensein von ACTH in der Hypophyse des Menschen um die 10. SSW wurde immunhistochemisch bestätigt (Baker und Jaffe 1975). Erst ab der 16. SSW (0.42 Gestationsdauer) war das Ausmaß der ACTH-Ausschüttung auf eine CRH-Stimulation mit der Ausschüttung einer adulten Hypophyse vergleichbar (Gyevai 1980). Beim fetalen Schaf wurde eine ACTH-Ausschüttung nach CRH-Gabe am 95. Gestationstag (0.63 Gestationsdauer) und später gesehen (Hargrave und Rose 1986, Brooks et al. 1987). In der Literatur gibt es keine Angaben bezüglich einer ACTH-Ausschüttung beim fetalen Schaf vor dem 95. Gestationstag.

Obwohl ACTH erst um die 16. SSW (0,42 Gestationsdauer) in relevanten Mengen ausgeschüttet wird, ist die Nebennierenrinde des Menschen bereits in der 10. SSW (0,26 Gestationsdauer) in der Lage, Kortisol und dessen Vorstufen zu produzieren und auszuschütten (Murphy 1973, Partsch et al. 1991, Seron-Ferre et al. 1978). ACTH scheint damit nicht der einzige Stimulator der fetalen Nebennierenrinde zu sein. Vermutlich stimulieren zusätzlich sowohl Östrogene als auch fetales und plazentares CRH die Kortisolproduktion v.a. während der frühen Schwangerschaft (Midgley et al. 1998). Die Kortisolsynthese in der fetalen Nebennierenrinde des Menschen erfolgt in der frühen Schwangerschaft vermutlich durch Umwandlung von zirkulierendem Progesteron (Macnaughton et al. 1977), da erst in der 30. SSW die Schlüsselenzyme für eine de-novo-Synthese von Kortisol vollständig entwickelt sind (Mesiano und Jaffe 1997). Die Nebennierenrindenzellen beim fetalen Schaf sind ab dem 50. Gestationstag (0,33 Gestationsdauer) fähig, Kortisol auf eine ACTH-Stimulation hin auszuschütten (Wintour et al. 1975). Ab dem 90. bis 120. Gestationstag (0,6 bis 0,8 Gestationsdauer) folgt beim fetalen Schaf eine Ruhephase der Nebennierenrindenaktivität, in der die Kortisolproduktion wieder abnimmt (Wintour et al. 1975). Analog zur Abnahme der Kortisolausschüttung ab dem 90. Gestationstag (0,6 Gestationsdauer) wurde auch

eine verminderte Expression der Kortisol-mRNA nachgewiesen (Keller-Wood et al. 2006). Eine „Ruhephase“ der Nebennierenrindenaktivität beim Menschen ist in der Literatur nicht beschrieben.

Die hypothalamischen und hypophysären Mineralo- und Glukokortikoidrezeptoren konnten erst in der zweiten Schwangerschaftshälfte nachgewiesen werden (siehe Abbildung 1) (Noorlander et al. 2006, Yang et al. 1990, Brodhun M et al. 2003, Rose et al. 1985). Auch die mRNA der Mineralo- und Glukokortikoidrezeptoren im Hypothalamus und der Hypophyse des fetalen Schafes wird erst vom 80. Gestationstag (0,53 Gestationsdauer) an exprimiert und entwickelt sich über den gesamten Schwangerschaftsverlauf (Keller-Wood et al. 2006). Damit können sowohl beim Menschen als auch beim fetalen Schaf die Mineralo- und Glukokortikoide sowie ihre Vorstufen, die bereits in der ersten Schwangerschaftshälfte ausgeschüttet werden (siehe oben), erst später wirken.



**Abbildung 1**

Entwicklung der Glukokortikoidrezeptoren beim fetalen Schaf (Gestationsdauer 150 Tage)

Die Reifung der koordinierten Funktion der einzelnen Komponenten der fetalen HHN-Achse findet im letzten Trimenon statt. Sowohl beim Menschen (28. SSW/0,74 Gestationsdauer) als auch beim fetalen Schaf (122. bis 135. Gestationstag/ 0,81 bis 0,9 Gestationsdauer) steigt die CRH-Ausschüttung gegen Ende der Schwangerschaft stark an (Goland et al. 1986, Campbell et al. 1987, Brieu et al. 1989, Brooks und Challis 1988). Mit gleichzeitiger Reifung der Rezeptoren steigt ebenfalls die Sensitivität der Hypophyse gegenüber CRH (Norman et al. 1985, Challis und Brooks 1989) und es kommt konsekutiv in beiden Spezies zu einer erhöhten ACTH-Ausschüttung wenige Tage vor der Geburt (Mensch: 0,86 Gestationsdauer, fetales Schaf: 0,81 – 0,9 Gestationsdauer) (Fowden et al. 1998, Challis et al. 2000, Wood 2005). Auch die Sensitivität von ACTH gegenüber der Nebennierenrinde steigt, sodass die Kortisolausschüttung ebenfalls erhöht wird (Fowden et al. 1998, Challis et al. 2000, Norman et al. 1985, Challis und Brooks 1989). Eine erhöhte Kortisolausschüttung aktiviert die Prostaglandin-Synthase und führt somit zu einer Steigerung der Prostaglandinbiosynthese (Rice et al. 1990, Challis et al. 1976). Prostaglandine sind u.a. an der Einleitung uteriner Kontraktionen beteiligt (Mesiano und Jaffe 1997).

Eine späte Reifung der koordinierten Funktion der fetalen HHN-Achse mit der ACTH-stimulierten, ausreichend hohen Sekretion von Kortisol macht biologisch Sinn, da so die Geburt eingeleitet wird (Challis et al. 2000).

#### *b. Die Entwicklung des Sympathikus*

Das katecholaminerge System entwickelt sich aus Zellen der Neuralleiste, welche sich in sympathische Ganglienzellen und in Zellen des Nebennierenmarks differenzieren (Weston 1970). Nachdem die Nebennieren beim Menschen in der 6. SSW angelegt sind, folgt ein Reifungsprozess mit Zellmigration, Zellproliferation und Vaskularisation mit dem Höhepunkt der Zellproliferation zwischen der 17. und 20. SSW (0,45 bis 0,53 Gestationsdauer) (Artal 1980). Die Zellen des Nebennierenmarks differenzieren sich dabei in chromaffine Zellen und Zellen mit Katecholamingranula (Artal 1980). Die Katecholaminsynthese findet in erster Linie im Nebennierenmark statt. Zusätzlich werden Katecholamine auch in extramedullären paraaortalen chromaffinen Zellen sowie in sympathischen Nervenenden synthetisiert (Artal 1980). Grundsätzlich reift das Nebennierenmark des Menschen intrauterin nicht vollständig, sondern durchläuft

den Reifungsprozess während der ersten drei Lebensjahre (Artal 1980, Coupland 1965).

In-vitro Analysen von Geweben des Nebennierenmarks beim fetalen Schaf haben gezeigt, dass am 100. Gestationstag (0,66 Gestationsdauer) das zelluläre Gerüst mit zentromedullären und juxtamedullären Zellen entwickelt ist (Boshier et al. 1989). Die Zellen beinhalten fast ausschließlich Noradrenalin-Granula (Boshier et al. 1989). Am 125. Gestationstag (0,83 Gestationsdauer) konnten in den Zellen auch Granula nachgewiesen werden, welche Adrenalin enthielten (Boshier et al. 1989). Die Synthese von Adrenalin erfolgt durch Methylierung von Noradrenalin über das Enzym „Phenylethanolamin-N-methyltransferase“, welches durch Glukokortikoide aktiviert wird (Coupland 1953). Über in-vivo Stimulation des Nervus splanchnikus beim fetalen Schaf wurde eine rasch zunehmende Freisetzung von Noradrenalin und Adrenalin ab dem 125. Gestationstag (0,83 Gestationsdauer) nachgewiesen (Comline und Silver 1961). Die Voraussetzung dafür ist die zunehmende Ausbildung der Synapsen zwischen den präganglionären sympathischen Nervenfasern und dem Nebennierenmark bis zum 130. Gestationstag (Boshier et al. 1989).

#### *c. Die Rolle der Plazenta bei der Entwicklung der Stressachse*

Neben dem Hypothalamus, der Hypophyse und der Nebennierenrinde übernimmt sowohl beim Menschen als auch beim fetalen Schaf die Plazenta einen Teil der Produktion von CRH und ACTH (Jones und Challis 1990, Petraglia et al. 1996, Krieger 1982). Die Produktion von geringen Mengen an placentarem CRH und ACTH wurde beim Menschen bereits in der siebten bzw. achten SSW (0,18 bzw. 0,21 Gestationsdauer) nachgewiesen (Frim et al. 1988, Okamoto et al. 1990, Waddell und Burton 1993, Liotta et al. 1977). Tierexperimentelle Studien beim fetalen Schaf konnten eine placentare Produktion von CRH und ACTH am 125. Gestationstag (0,83 Gestationsdauer) zeigen (Keller-Wood und Wood 1991b, Keller-Wood und Wood 1991a, Wood und Keller-Wood 1991, Jones et al. 1989).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen placentarem CRH und ACTH und hypothalamisch bzw. hypophysärem CRH und ACTH ist der fehlende negative Feedbackmechanismus in der Plazenta (Challis et al. 2000). Hier existiert ein positives Feedback. Fetales Kortisol führt zu einer Stimulation der placentaren CRH-Synthese (Robinson et al. 1988). Das placentare CRH aktiviert sowohl die Kortisolausschüttung



der fetalen Nebennierenrinde (Mesiano und Jaffe 1997) als auch die plazentare ACTH-Produktion (Frim et al. 1988). Der Feed-Forward-Mechanismus verstärkt die Kortisolausschüttung vor der Geburt und trägt damit entscheidend zur Geburtseinleitung bei (Frim et al. 1988).

*d. Einfluss von pränatalem Stress auf die Reifung und Funktion der fetalen HHN-Achse*

Die Funktion der Stressachse im späteren Leben kann durch frühe Umweltflüsse programmiert werden. Solche programmierenden Umwelteinflüsse sind verschiedene Formen von Stress.

Zwei wichtige Stressoren sind mütterlicher psychischer Stress und die therapeutische Gabe von synthetischen Glukokortikoiden. Klinisch werden Glukokortikoide pränatal bei etwa 10% der Schwangeren zur Induktion der fetalen Lungenreife bei drohender Frühgeburt verabreicht (Polyakov et al. 2007). Generell stellen Glukokortikoide einen starken, jedoch unspezifischen Reifungsstimulus dar (Aghajafari et al. 2002, Seckl 2004). Diese Reifungsinduktion betrifft demnach nicht nur die fetale Lunge sondern auch andere Organe und Organfunktionen, welche in Reifung begriffen sind, wie z.B. das fetale Gehirn mit der Stressachse (Aghajafari et al. 2002). Neben einer vorzeitigen Reifung führen Glukokortikoide auch zu einer Programmierung von Fehlfunktionen in Organsystemen (Seckl 2004). Hierzu reicht bereits eine einmalige kurze Erhöhung der Glukokortikoidspiegel, wenn diese während der vulnerablen Entwicklungsphase bestimmter Organe geschieht (Schwab 2009).

Sowohl mütterlicher psychischer Stress, als auch die pränatale Gabe von Glukokortikoiden führt zu einer dauerhaften Überaktivität der HHN-Achse. So reagierten Feten, deren Mütter während der Schwangerschaft psychischen Stress erfahren hatten, auf eine Blutentnahme 24 Stunden nach der Geburt mit einer überschießenden und prolongierten Kortisolausschüttung als Ausdruck einer erhöhten Stressantwort (Davis et al. 2011b). Auch Kinder, deren Mütter in der frühen Schwangerschaft Stress in Form von Angstzuständen hatten, fielen im 15. Lebensjahr durch eine erhöhte Kortisolausschüttung auf (Van den Bergh et al. 2008). Tierexperimentell konnte eine erhöhte Stresssensitivität nach mütterlichem psychischem Stress reproduziert werden. Hierbei reagierten Ratten, deren Muttertiere pränatal psychischem Stress ausgesetzt waren, mit einer erhöhten

Kortisolausschüttung unter Basalbedingungen (Abe et al. 2007) und im Zuge einer Stressreaktion (Maccari et al. 1995).

Auch ein Behandlungszyklus mit Betamethason (bestehend aus 2 x 12 mg oder 4 x 6 mg Betamethason über 48 Stunden), der zur Lungenreifeinduktion durchgeführt wird, führte bei Neugeborenen sowie bei Kindern im Alter von sechs bis elf Lebensjahren zu einer erhöhten Kortisolausschüttung während einer Stressreaktion (Alexander et al. 2012, Davis et al. 2011a). Eine Assoziation zwischen pränataler Glukokortikoidgabe und einer Überaktivierung der fetalen Stressachse wurde ebenfalls tierexperimentell gezeigt. So reichte die Durchführung von zwei Behandlungszyklen mit Betamethason beim fetalen Schaf im letzten Trimenon (0,7 und 0,75 Gestationsdauer) aus, um eine überschießende Ausschüttung von fetalem ACTH und Kortisol auf einen Blutdruckabfall am Ende der Schwangerschaft (0,85 Gestationsdauer) zu bewirken (Schwab et al. 2012). Erhöhte basale ACTH-Spiegel sowie steigende basale Kortisolspiegel wurden außerdem nach mehreren Behandlungszyklen mit Betamethason (0,7 bis 0,8 Gestationsdauer) beim fetalen Schaf im letzten Trimenon (0,97 Gestationsdauer) nachgewiesen (Sloboda et al. 2000).

Pathophysiologisch liegen der Programmierung der fetalen Stressachse epigenetische Veränderungen (u.a. DNA-Hypermethylierung) auf Rezeptorebene zu Grunde (Harris und Seckl 2011). Hier kommt es nicht nur zu einer verminderten Affinität von Glukokortikoidrezeptoren gegenüber Glukokortikoiden sondern auch zu einer verminderten Expressionsdichte von hippocampalen und hypothalamischen Glukokortikoidrezeptoren (Welberg und Seckl 2001, Maccari et al. 1995). Die verminderte Sensitivität und die verminderte Zahl an Glukokortikoidrezeptoren im Hypothalamus und in der Hypophyse geht mit einer Abschwächung des negativen Feedbackmechanismus einher (Welberg und Seckl 2001). Das verminderte negative Feedback führt zu den beobachteten dauerhaft erhöhten Kortisolspiegeln unter Basalbedingungen sowie im Zuge einer Stressantwort (Barbazanges et al. 1996).

#### 2.3.1.3 Vulnerable Phasen der Entwicklung der fetalen HHN-Achse

Wie im vorherigen Kapitel bereits angedeutet, ist für die Programmierung der Aktivität der fetalen Stressachse in erster Linie der Zeitpunkt des Stresses relevant (Kapoor et al. 2006). So sind die einzelnen Komponenten der fetalen Stressachse während ihrer jeweiligen Entwicklungsphase besonders vulnerabel gegenüber Stress (Schwab

2009). Dabei ist die Vulnerabilität hinsichtlich der Funktion der fetalen Stressachse in der frühen Schwangerschaft am größten (Van den Bergh et al. 2008). In epidemiologischen Studien fielen Jugendliche, deren Mütter während der frühen Schwangerschaft psychischen Stress erfahren hatten, durch eine erhöhte Kortisolausschüttung während einer Stressreaktion, im Vergleich zu Jugendlichen nicht gestresster Mütter, auf (Van den Bergh et al. 2008). Tierexperimentelle Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben bestätigt, dass fetale Schafe, deren Muttertiere in der frühen Schwangerschaft (0,2 bis 0,67 Gestationsdauer) gestresst wurden, eine deutlich erhöhte Stresssensitivität aufwiesen, als Feten, deren Muttertiere in der späten Schwangerschaft Stress erfahren hatten (0,67 bis 0,8 Gestationsdauer) (Rakers et al. 2013).

Analog zu mütterlichem psychischem Stress könnte auch bei der pränatalen Gabe von Glukokortikoiden ein vulnerables Zeitfenster mit relevanten Effekten auf die heranreifende fetale Stressachse existieren. In der klinischen Praxis werden Glukokortikoide hauptsächlich zur Induktion der fetalen Lungenreife innerhalb des empfohlenen Zeitfensters in der späten Schwangerschaft zwischen der 24. und 34. SSW eingesetzt (Davis et al. 2011a). Indikationen für eine Glukokortikoidbehandlung in der frühen Schwangerschaft bestehen z.B. bei Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose oder bei endokrinologischen Störungen wie Diabetes mellitus oder einer kongenitalen adrenalen Hyperplasie (Speiser und New 1994, Ferrero et al. 2006). Dennoch existieren wegen des relativ seltenen klinischen Einsatzes von Glukokortikoiden während der frühen Schwangerschaft keine Vergleichsstudien hinsichtlich der Langzeiteffekte auf die Funktion der fetalen Stressachse zu verschiedenen Behandlungszeitpunkten.

### **2.3.2 Effekte auf das Wachstum**

Zahlreiche Studien beim Menschen sowie Experimente an verschiedenen Tiermodellen (wie Schaf, Ratte, Maus) konnten zeigen, dass pränataler Stress mit einem verminderten Wachstum und einem erniedrigten Geburtsgewicht verbunden ist (Field et al. 2006, Weinstock 2008).

In einer schwedische Populationsstudie wurden Kinder, deren Mütter während der Schwangerschaft den Verlust eines nahestehenden Angehörigen erlebt hatten, mit einem niedrigeren Geburtsgewicht geboren als vergleichbare Kinder nicht gestresster

Mütter (Class et al. 2011). Weitere Studien belegen, dass auch subjektiv empfundener emotionaler Stress und Stress in Verbindung mit Naturkatastrophen zu einem verminderten Wachstum der Feten führte (Diego et al. 2006, Laplante et al. 2004).

Pathophysiologisch bewirkt die stressassoziierte Exposition der Feten gegenüber Kortisol einen Reifungsstimulus (Aghajafari et al. 2002). Die beschleunigte Reifung geht allerdings auf Kosten der Zellproliferation, was sich in einem verminderten Wachstum widerspiegelt (Moss et al. 2005, Barker et al. 1989, French et al. 1999). Diese Wachstumsminderung wird über eine verminderte Ausschüttung von „Insuline-like Growth Faktor“ (IGF), dem wichtigsten Wachstumsfaktor in der fetalen Entwicklung, vermittelt (Gluckman 1995, Gicquel und Le Bouc 2006).

Die Effekte von mütterlichem psychischem Stress auf das IGF-System sind bei Ratten untersucht worden. Hierbei blieb nach pränataler starker Lichtexposition eine Änderung der IGF-Spiegel im peripheren Blut der fetalen Ratten zwar aus, aber es wurden verminderte IGF-Protein-Spiegel im Hippocampus und im Neokortex nachgewiesen (Basta-Kaim et al. 2014). Weiterhin führte eine pränatale Glukokortikoidgabe bei Ratten zu einer verminderten Bioaktivität von IGF (Price et al. 1992, Luo und Murphy 1989).

Bezüglich des Mechanismus konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Stress zu einer Hypermethylierung und möglicherweise konsekutiver Genrepression des H19-Locus, welcher IGF kodiert, führt (unveröffentlichte Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe).

### **2.3.3 Programmierung von Organfunktionen**

Sowohl die durch mütterlichen Stress bedingte Überaktivität der fetalen Stressachse als auch der Einfluss auf die fetale Organreifung führen zu veränderten Organfunktionen im späteren Leben. Hiervon sind insbesondere Organe mit großer Plastizität wie das kardiovaskuläre System, das Verdauungssystem oder auch das zentrale Nervensystem betroffen (Schwab 2009). Da die Programmierung der Organfunktion nur während der Reifung erfolgt, sind insbesondere Organe mit langer Entwicklungsdauer, wie das Gehirn, gegenüber Stress vulnerabel (Schwab 2009).

### 2.3.3.1 Das kardiovaskuläre System

Verschiedene Stressoren, wie mütterlicher psychischer Stress oder eine Behandlung mit Glukokortikoiden, führen zu einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität im späteren Leben (Seckl 2004).

Es gibt wenige epidemiologische Studien hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen mütterlichem psychischem Stress während der Schwangerschaft und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bei den Nachkommen. Van Dijk et al. konnten bei Kindern im Alter von fünf bis sieben Lebensjahren nach mütterlichem psychischem Stress während der Schwangerschaft eine Tendenz zu erhöhtem Blutdruck zeigen (van Dijk et al. 2010). Auch 14-jährige Jugendliche, welche intrauterin wegen einer drohenden Frühgeburt mit einem Behandlungszyklus Betamethason therapiert wurden, fielen durch einen erhöhten Blutdruck auf (Doyle et al. 2000).

Tierexperimentell waren bei verschiedenen Spezies, wie Ratten oder Mäusen, ebenfalls erhöhte Blutdruckwerte bei den Nachkommen, deren Muttertiere während der Schwangerschaft psychischem Stress ausgesetzt waren, auffällig (Igosheva et al. 2004, Ho et al. 2013, Sanders et al. 2004). Auch eine pränatale Glukokortikoidgabe bei den Muttertieren führte zu persistierenden erhöhten basalen Blutdruckwerten bei den Nachkommen in verschiedenen Spezies, wie Schaf, Ratte oder Primat (Dodic et al. 1998, Berry et al. 1997, Tangelakis et al. 1992, Benediktsson et al. 1993, Sugden et al. 2001, de Vries et al. 2007, Koenen et al. 2002).

Die Assoziation zwischen pränatalem Stress und der Prädisposition für kardiovaskuläre Erkrankungen kann Ausdruck einer Überaktivität der Stressachse sein (O'Regan et al. 2008). Pränataler mütterlicher Stress führte zu einer vermehrten Kortisolausschüttung mit konsekutiver Blutdruckerhöhung (Painter et al. 2012). Persistiert die erhöhte Kortisolausschüttung durch eine Überaktivität der Stressachse, kommt es zu einem dauerhaften arteriellen Hypertonus, der den Grundstein für ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen im späteren Leben legt (Seckl 2004). Weitere Ursachen für einen persistierenden arteriellen Hypertonus sind durch eine Stress-induzierte erhöhte vaskuläre Sensitivität gegenüber Vasokonstriktoren sowie durch eine verminderte Produktion von Vasodilatoren wie z.B. Stickstoffmonoxid gegeben (Molnar et al. 2002, Molnar et al. 2003). Neben einer Überaktivität der Stressachse und einer Änderung der Vasoreagibilität beeinflusst eine

präinatale Glukokortikoidgabe auch die Nephrogenese. In verschiedenen Spezies (u.a. Schaf, Ratte) konnte eine irreversible Reduktion der Nephrone festgestellt werden (Ortiz et al. 2001, Wintour et al. 2003). Eine verringerte Anzahl an funktionsfähigen Nephronen führt zu einer Überlastung der verbliebenen Nephrone mit konsekutiver Schädigung (Schreuder und Nauta 2007, Zandi-Nejad et al. 2006). Nicht zuletzt beeinflusst eine präinatale Glukokortikoidgabe in der frühen Schwangerschaft die Entwicklung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems im Feten. Hierbei kam es zu einer erhöhten Expression der mRNA von Angiotensinogen sowie von Angiotensin<sub>1</sub>- und Angiotensin<sub>2</sub>- Rezeptoren in der fetalen Niere (Moritz et al. 2002). Dies könnte zur Entwicklung eines arteriellen Hypertonus im späteren Leben ebenfalls beitragen (Seckl und Meaney 2006)

### 2.3.3.2 Das metabolische System

Neben den Effekten auf die kardiovaskuläre Entwicklung beeinflusst präinataler Stress auch die Reifung des metabolischen Systems. Grundlage dieser Effekte ist der Einfluss von Stresshormonen wie Kortisol auf den Glukosestoffwechsel (Fowden et al. 1993).

Es existieren nur wenige epidemiologische Studien bezüglich des Einflusses von mütterlichem psychischem Stress während der Schwangerschaft auf das metabolische System. Die Kinder, deren Mütter präinatal Betamethason zur Lungenreifeinduktion in therapeutischer Dosis erhalten hatten, reagierten im Alter von 30 Jahren auf einen oralen Glukosetoleranztest mit einer überschießenden Insulinausschüttung und konsekutiv erniedrigtem Blutglukosespiegel (Dalziel et al. 2005).

Tierexperimentell führte mütterlicher psychischer Stress während der Schwangerschaft bei den adulten Ratten der F1-Generation zu einer Hyperglykämie unter Basalbedingungen sowie nach Glukosegabe (Lesage et al. 2004, Vallee et al. 1996). Auch eine therapeutische präinatale Glukokortikoidbehandlung mit Dexamethason in der frühen (0,18 Gestationsdauer) oder mit Betamethason in der späten Schwangerschaft (ab 0,7 Gestationsdauer) führte bei adulten Schafen der F1-Generation zu erhöhten Nüchtern-Blutglukosespiegeln sowie zu erhöhten Blutglukosespiegeln mit konsekutiver überschießender Insulinausschüttung nach Glukosegabe (De Blasio et al. 2007, Moss et al. 2001). Bei sechs Monate alten Ratten,

welche pränatal gegenüber hohen Konzentrationen von natürlichen Glukokortikoiden durch Hemmung der „11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase“ (11 $\beta$ -HSD) exponiert waren, wurden ebenso erhöhte Nüchtern-Blutglukosespiegel sowie eine erhöhte Insulinausschüttung nach Glukosegabe festgestellt (Lindsay et al. 1996a). Eine pränatale Exposition der Ratten gegenüber synthetischen Glukokortikoiden zeigte ähnliche Effekte (Nyirenda et al. 1998).

Pathophysiologisch liegt der Stress-induzierten Hyperglykämie eine Aktivierung der Glukoneogenese zu Grunde. Dabei wird das Schlüsselenzym Phosphoenolpyruvat-Karboxykinase (PEPCK), welches physiologisch die Glukoneogeneserate reguliert und limitiert, durch Glukokortikoide aktiviert und es folgt ein unkontrollierter Anstieg der Blutglukosekonzentration (Friedman et al. 1993, Seckl und Meaney 2006, Fowden et al. 1993). Erhöhte Glukokortikoidspiegel während der frühen Entwicklung sind allerdings nicht nur in der Lage, die PEPCK zu aktivieren, sondern auch über eine Induktion der Transkription des PEPCK-Gens die Expression von PEPCK dauerhaft zu steigern (Friedman et al. 1993). Somit programmiert pränataler mütterlicher Stress eine Glukoseintoleranz, welche bis ins Erwachsenenalter anhält und kann damit den Grundstein für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 legen (Nyirenda et al. 1998, Lesage et al. 2004).

#### 2.3.3.3 Das zentrale Nervensystem

Pränataler Stress geht mit einem erhöhten Risiko für Verhaltensauffälligkeiten, kognitive Störungen sowie psychiatrische Erkrankungen, wie Depression oder Schizophrenie, einher (Kofman 2002, Van den Bergh et al. 2005a, Weinstock 2008). Aufgrund der langen Entwicklungsphase ist das zentrale Nervensystem des Feten besonders vulnerabel gegenüber pränatalen Stressoren.

Hinsichtlich der fetalen Entwicklung von Hirnfunktionen führte mütterlicher psychischer Stress vom 30. bis 100. Gestationstag (0,2 bis 0,66 Gestationsdauer) beim fetalen Schaf zu einer bis zum Ende der Schwangerschaft anhaltenden Fragmentierung der Schlafstadien (Rakers 2010). Eine Schlafstadienfragmentierung ist ein wesentliches Symptom der Depression (Tsuno et al. 2005). Nach mütterlichem psychischem Stress während der Schwangerschaft war bei den adulten Ratten der F1-Generation eine gestörte Schlafarchitektur nachweisbar (Dugovic et al. 1999). Auch eine pränatale, für Stress modellhafte Glukokortikoidbehandlung beeinflusst die funktionelle

Hirnentwicklung des Feten. Im letzten Trimenon führte bereits ein Behandlungszyklus mit Betamethason, in der klinisch zur Lungenreifeinduktion verwendeten Dosis, beim fetalen Schaf zu einer frühzeitigen Reifung des REM-Schlafes und zu einer Schlaffragmentierung, wie sie ebenso nach mütterlichem Stress während der Schwangerschaft beobachtet wurde (Groh 2009). Ursache dafür ist die späte Reifung des REM-Schlafes (cholinerges System), sodass sich dieser zum Zeitpunkt der o.g. Glukokortikoidgabe in einer vulnerablen Phase der Entwicklung befindet und daher im Sinne einer frühzeitigen Reifung programmiert wird (Groh 2009). Im Gegensatz dazu ist das den NonREM-Schlaf vermittelnde serotonerge System im letzten Trimenon bereits ausgereift und bleibt damit von der Glukokortikoidgabe unbeeinflusst (Groh 2009). Weiterhin verzögert eine pränatale Betamethasongabe die Reifung der akustisch und sensorisch evozierten Potenziale (Weiss et al. 2007, Anegroaie et al. 2015 (in press)). Dies beruht möglicherweise auf einer Verzögerung der Myelinisierung (Antonow-Schlorke et al. 2009).

Die Effekte auf die Hirnfunktion bleiben auch postnatal nachweisbar. So führte mütterlicher psychischer Stress während der Schwangerschaft, selbst in Form eines einmaligen traumatischen Ereignisses, wie einem über mehrere Tage anhaltenden, schweren Eissturm (01/1998, Québec, Canada), zu intellektuellen und sprachlich-kognitiven Defiziten bei den Nachkommen im Kleinkindalter (Laplante et al. 2004). Außerdem zeigten Kinder pränatal gestresster Mütter neben schlechteren Schulleistungen (Niederhofer und Reiter 2004) und impulsivem Verhalten (Van den Bergh et al. 2005b) eine erhöhte Inzidenz für Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörungen (Van den Bergh und Marcoen 2004). Weiterhin hatte mütterlicher psychischer Stress während der Schwangerschaft durch z.B. schwere Krankheit des Kindsvaters oder durch Kriegserlebnisse, wie die Invasion der deutschen Armee in die Niederlande 1940, eine erhöhte Lebenszeitprävalenz für Schizophrenie bei den Nachkommen zur Folge (van Os und Selten 1998, Khashan et al. 2008, Huttunen und Niskanen 1978). Auch das Risiko für Depression im späteren Leben war bei Nachkommen, deren Mütter während der Schwangerschaft ein Erdbeben erlebt hatten, deutlich erhöht (Watson et al. 1999). Nicht zuletzt wurde eine Überaktivität der HHN-Achse bei den Kindern von pränatal gestressten Müttern durch erhöhte Kortisolspiegel nachgewiesen (siehe d) (Van den Bergh et al. 2008).



Diese Effekte konnten tierexperimentell reproduziert werden. Hierbei führte mütterlicher psychischer Stress bei adulten Mäusen und Ratten u.a. zu erheblichen Defiziten hinsichtlich räumlichen Lernens und Gedächtnistests (Yang et al. 2006, Ishiwata et al. 2005) sowie zu depressiven Verhaltensweisen (Alonso et al. 2000, Frye und Wawrzycki 2003, Abe et al. 2007, Basta-Kaim et al. 2014).

Auch die pränatale Gabe von Glukokortikoiden führte zu kognitiven Defiziten und Verhaltensstörungen im späteren Leben. Hier ist die Studienlage jedoch uneinheitlicher. Dabei fallen Kinder, die zur Induktion der Lungenreife intrauterin mit Betamethason behandelt wurden, im Alter zwischen drei und sechs Jahren mit gereiztem Verhalten sowie hyperkinetischen Verhaltensstörungen auf (French et al. 2004). Auch Kinder im Alter von acht Jahren zeigten bereits nach einer einmaligen pränatalen Betamethasonbehandlung eine veränderte neuropsychologische Entwicklung, die sich jedoch in der breiten Spanne des Normalen befand (Schwab et al. 2010). Die Veränderungen gingen mit einer erhöhten Aktivierung im Elektroenzephalogramm unter Ruhebedingungen und einer verminderten Aktivität bei kognitiven Aufgaben sowie Verhaltensauffälligkeiten im Sinne eines Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom und einer gestörten Funktion der Stressachse einher (Schwab et al. 2010). Allerdings finden sich auch Studien, die keinen Effekt einer pränatalen Betamethasonbehandlung auf die kognitive Entwicklung oder auf das Verhalten zeigten (Thorp et al. 2003, Stutchfield et al. 2013, Hirvikoski et al. 2008). Die unterschiedlichen Effekte einer pränatalen Glukokortikoidgabe in epidemiologischen Studien lassen sich möglicherweise auf das Studiendesign zurückführen, wobei nicht nur der Zeitpunkt der Glukokortikoidgabe und überlagernde Effekte durch die Frühgeburt sondern auch die Untersuchungsmethoden bei den Kindern sowie postnatale Einflüsse, welche auf die Kinder wirken, die Beobachtungen beeinflussen können. Im Gegensatz dazu zeigen tierexperimentelle Studien unter standardisierten Bedingungen nach wiederholten Behandlungszyklen konsistent langfristig unerwünschte neuropsychiatrische Effekte und eine Überaktivität der fetalen HHN-Achse. Demnach führte eine pränatale Dexamethasongabe bei den adulten Ratten der F1-Generation zu einem gehemmten Verhalten im „open-field-test“ sowie zu depressivem Verhalten im „forced-swim-test“ (Welberg et al. 2001). Außerdem induzierte eine pränatale Dexamethasonbehandlung eine dauerhafte Hyperreaktivität der Stressachse bei Ratten (Bergmeier et al. 2013).

Als strukturelle Korrelate der Stress-induzierten Veränderung der Hirnfunktion wurden neben der gestörten Myelinisierung (siehe oben) auch verminderte Volumina in Hirnarealen, wie dem Hippocampus oder der Amygdala, welche für Lernen und Gedächtnis zuständig sind, beim Menschen nachgewiesen (Sandman et al. 2011). In Übereinstimmung hiermit war eine pränatale Glukokortikoidgabe mit einem verminderten Hirngewicht beim fetalen Schaf assoziiert (Moss et al. 2005). Weiterhin kam es nach pränatalem Stress zu einer Änderung der Rezeptorsensitivität sowie zu einer Beeinflussung des Dendritenwachstums und der Synapsenformation im präfrontalen Cortex und im limbischen System (Review siehe (Van den Bergh et al. 2005a, Yang et al. 2006)). Außerdem wurden nach pränataler Glukokortikoidgabe beim fetalen Schaf neurotoxische Effekte im Sinne einer Änderungen von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen, welche die synaptische Plastizität und neuronale Funktion regulieren, beobachtet (Schwab et al. 2001, Antonow-Schlorke et al. 2007).

Damit beeinflusst pränataler psychischer Stress oder eine pränatale Glukokortikoidgabe die Hirnfunktion im späteren Leben durch Effekte auf die fetale Hirnentwicklung und die Entwicklung der fetalen HHN-Achse. Die mit der Hyperaktivität der Stressachse einhergehenden zeitlebens erhöhten Kortisolspiegel führen u.a. zu einer Suppression von Serotonin (Field et al. 2004), was zu den beobachteten neuropsychiatrischen Störungen beiträgt.

## 2.4 Übertragung von pränatalem mütterlichem Stress auf den Feten

### 2.4.1 Plazentarer Transfer von Stresshormonen

#### 2.4.1.1 Kortisol

Bei der Übertragung von mütterlichem Stress auf den Feten wurde bisher dem mütterlichen Kortisol eine entscheidende Rolle zugeschrieben (Van den Bergh et al. 2005a). Man ging davon aus, dass mütterliches Kortisol zu einem kleinen Teil (etwa 10%) über die plazentare Schranke in den fetalen Blutkreislauf gelangt und dort eine Stressreaktion im Feten auslösen kann (Van den Bergh et al. 2005a).

Grundsätzlich wird der Fetus durch das Enzym 11 $\beta$ -HSD vor dem größten Teil des mütterlichen Kortisols geschützt (Xiong und Zhang 2013). Dieses in der Plazenta und im fetalen Gewebe exprimierte Protein wandelt aktives Kortisol in inaktives

Kortikosteron um und verhindert somit den Übertritt von etwa 90% des mütterlichen Kortisols (Wyrwoll und Holmes 2012, Xiong und Zhang 2013). Eine Hemmung der 11 $\beta$ -HSD mittels Carbenoxolon führte bei fetalen Ratten zu erhöhten Glukokortikoidspiegeln sowie zu einem erhöhten Blutdruck als Ausdruck einer gesteigerten Stressantwort (Welberg et al. 2000, Lindsay et al. 1996b). Auch mütterlicher psychischer Stress während der Schwangerschaft führte zu einer verminderten Expression und Aktivität der 11 $\beta$ -HSD (Mairesse et al. 2007) und damit zu einer überproportionalen Exposition des Feten gegenüber Glukokortikoiden (Mairesse et al. 2007). Demnach steigt bei mütterlichem Stress der Kortisolspiegel im Feten nicht nur durch den erhöhten Kortisolspiegel der Mutter, sondern auch auf Grund einer verminderten plazentaren Kortisol-Clearance (Mairesse et al. 2007, Van den Bergh et al. 2005a).

Allerdings werden fetale Glukokortikoidrezeptoren erst während der zweiten Hälfte der Schwangerschaft exprimiert (siehe 2.3.1.2). Damit bleibt unklar, wie ein erhöhter Kortisolspiegel die Stresseffekte auf den Feten vermitteln kann, insbesondere unter dem Aspekt, dass Stress in der frühen Schwangerschaft stärkere Effekte auf den Feten hat als Stress während der späten Schwangerschaft (Van den Bergh et al. 2008).

#### 2.4.1.2 Katecholamine

Katecholamine sind im Gegensatz zu Kortisol nicht in der Lage, die Plazenta zu passieren, sodass eine direkte Stressübertragung ausgeschlossen werden kann (Giannakouloupoulos et al. 1999). Nichtsdestotrotz wurden im Bereich der geburtshilflichen Anästhesie bei Frauen, die im Rahmen einer elektiven Sektio in Spinalanästhesie Ephedrin bzw. Norepinephrin erhalten hatten, sowohl metabolische Effekte als auch Veränderungen im Säure-Base-Haushalt des Feten beobachtet (Ngan Kee et al. 2009).

Jene Veränderungen könnten über eine stressbedingte Reduktion der uterinen Perfusion auf Grund einer Vasokonstriktion im uterinen Gefäßbett vermittelt werden. Dies ist bisher nicht untersucht worden.

### 3 Ziele der Arbeit

Das derzeit akzeptierte Konzept, welches die Übertragung von mütterlichem Stress auf den Feten alleinig über den transplazentaren Übertritt von Kortisol erklärt, steht im Widerspruch zu neueren klinischen und experimentellen Befunden. So hat mütterlicher psychischer Stress während der frühen Schwangerschaft die stärksten Effekte auf die Entwicklung von neuropsychiatrischen Auffälligkeiten im späteren Leben. Diese Effekte sind konsistent sowohl in verschiedenen Tierspezies als auch beim Menschen nachweisbar. Demgegenüber steht die Tatsache, dass sowohl beim Menschen, als auch bei den meisten Säugetieren die Funktion der HHN-Achse erst am Ende der Schwangerschaft reift (siehe 2.3.1.2). Auch die fetalen Glukokortikoidrezeptoren sind erst in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft nachweisbar (2.3.1.1). Demzufolge müssen weitere Kortisol-unabhängige Mechanismen der Stressübertragung von der Mutter auf den Feten existieren. Bisher wurde Katecholaminen keine größere Rolle bei der Stressübertragung beigemessen, da diese die Plazentaschranke nicht passieren können (siehe 2.4.1.1). Möglicherweise tragen Katecholamine jedoch über einen indirekten Mechanismus zur Stressübertragung bei. So ist aus Experimenten beim trächtigen Schaf bereits bekannt, dass eine Katecholamininfusion zu einer uterinen Vasokonstriktion führt (Barton et al. 1974).

Wir stellten drei Hypothesen zur Rolle von Katecholaminen bei der Übertragung von mütterlichem Stress auf den Feten auf:

1. *Pränataler Stress führt über eine uterine Vasokonstriktion zu einer Reduktion der fetalen Blutversorgung und induziert hierdurch Stress im Feten.*
2. *Die Stress-induzierte uterine Vasokonstriktion wird durch Katecholamine vermittelt.*
3. *Die Stress-induzierte uterine Vasokonstriktion führt insbesondere während des fetalen exponentiellen Wachstums am Ende der Schwangerschaft zu einer relativen Mangelversorgung des Feten.*

Das fetale Schaf ist das etablierte Tiermodell für die menschliche Fetalperiode. Die Entwicklung der Stressachse und des Gehirns findet beim Schaf analog zum Menschen perinatal statt (siehe 2.3.1.2). Weiterhin lässt sich das fetale Schaf im Gegensatz zu anderen Spezies auf Grund der Größe und Robustheit der Feten

chronisch instrumentieren, um fetalphysiologische Untersuchungen vorzunehmen und verschiedene Parameter wie die uterine Durchblutung, mütterliche und fetale kardiovaskuläre Parameter (wie Blutdruck und Herzfrequenz) und Blutparameter (wie Kortisol, Katecholamine, Blutgase, Glukose- und Laktatwerte) zu messen. Zudem kommen im Gegensatz zu anderen Großtiermodellen, wie z.B. dem Schwein, im Schafmodell nur Einlings- und Zwillingschwangerschaften vor. Im eigenen Versuchslabor wurde in Vorversuchen ein artgerechtes Modell für mütterlichen psychischen Stress am Schaf entwickelt (Rakers 2010). Die Versuche wurden zum frühestmöglichen Zeitpunkt, an dem sich ein Schaffetus chronisch instrumentieren lässt (0,73 der Gestationsdauer) und am Ende der Schwangerschaft (0,86 der Gestationsdauer) zum Zeitpunkt des größten fetalen Wachstums durchgeführt.

Zur Bestätigung unserer Hypothesen stressten wir die trächtigen Muttertiere durch Isolation und zeichneten währenddessen den UBF sowie die mütterliche und fetale Stressantwort mit Blutdruck, Herzfrequenz, Blutgasen, metabolischen Parametern und Katecholamin- und Kortisolantworten auf. Dabei fanden wir einen durch Stress bedingten Abfall der uterinen Durchblutung. Zur Klärung, inwieweit Katecholamine für den uterinen Durchblutungsabfall verantwortlich sind, wurde die Stressung der trächtigen Muttertiere unter sympathoadrenerger Blockade mit Labetalol, einem kombinierten  $\alpha_1$ - und  $\beta_{1,2}$ -Adrenorezeptor-Antagonisten, sowie Urapidil, einem  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor-Antagonisten wiederholt. Wenn Stress Kortisol-unabhängig indirekt durch einen Katecholamin-bedingten Abfall des UBF übertragen wird, sollte nach sympathoadrenerger Blockade der UBF nicht abfallen und die fetale Stressantwort ausbleiben. Wir wählten sowohl einen kombinierten  $\alpha_1$ - und  $\beta_{1,2}$ -Adrenorezeptor-Antagonisten, als auch einen reinen  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor-Antagonisten, um einerseits die jeweiligen Anteile der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Adrenorezeptoren an der Stressübertragung zu differenzieren und andererseits die zentralen Effekte von Urapidil abzugrenzen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Allgemeiner Versuchsüberblick

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten stammen aus komplexen Tierexperimenten am chronisch instrumentierten fetalen Schaf. Dieses bereits seit den 1960er Jahren verwendete Tiermodell ist eines der wichtigsten Tiermodelle der Schwangerschaftsphysiologie. Bedeutende und weltweit angewandte geburtsmedizinische Therapien, wie die pränatale Glukokortikoidtherapie zur Beschleunigung der fetalen Lungenreifung, wurden an diesem Modell entwickelt (Ballard et al. 1997). Die Ähnlichkeit der Schwangerschaftsphysiologie zwischen Schaf und Mensch sowie die Robustheit der Feten, welche die chronische intrauterine Instrumentierung erlaubt, machen es zu einem idealen Modell, um die Fragestellung dieser Arbeit zu beantworten.

Der gesamte Versuchsablauf von der terminierten Verpaarung bis hin zu den akuten Isolationsversuchen konnte auf Grund der langen Zeitspanne, sowie der Komplexizität und Variation der verschiedenen Aufgabenbereichen von einem Team bestehend aus Humanmedizinerinnen, Veterinärmedizinerinnen sowie Tierpflegern realisiert.

Der Versuchsablauf teilte sich in zwei konsekutive Abschnitte:

Der Versuchsabschnitt A beinhaltete hierbei die terminierte Verpaarung der Schafe sowie die Randomisierung der Tiere in zwei Kontrollgruppen: eine frühe und eine späte Kontrollgruppe.

Im Versuchsabschnitt B erfolgten die chirurgische Instrumentierung und die anschließenden akuten Isolationsversuche. Dabei wurde die chirurgische Instrumentierung einerseits zum frühestmöglichen Zeitpunkt (frühe Kontrollgruppe, 104.  $\pm$  2 Gestationstag) und andererseits zum Zeitpunkt des größten exponentiellen Wachstums (späte Kontrollgruppe, 124.  $\pm$  2 Gestationstag) durchgeführt. Hierzu wurden beide Gruppen einmalig einem akutem Isolationsstress ausgesetzt, wobei sowohl die uterine Durchblutung (UBF) als auch weitere physiologische Stressparameter (wie Blutdruck, Herzfrequenz, Blutgase, metabolische Parameter und Katecholamin- und Kortisolspiegel) des Muttertieres und des Feten gemessen wurden. Einige Muttertiere der späten Kontrollgruppe erfuhren zusätzlich zu den oben

genannten Isolationsversuchen zwei weitere Isolationsversuche am 132. und am 134. Gestationstag. Hierbei wurde dem Muttertier im Vorfeld jeweils intravenös ein gemischter  $\alpha_1$ - und  $\beta_{1,2}$ -Adrenorezeptor-Antagonist (Labetalol) bzw. ein reiner  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor-Antagonist (Urapidil) injiziert.

Die terminierte Verpaarung und die Haltung der Tiere fanden in einer Schäferei in Thüringen statt. Die chirurgische Instrumentierung und die Datenerhebung wurden am Institut für Versuchstierkunde und Tierschutz der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt. Alle aufgeführten Experimente wurden durch die Tierschutzkommission des Freistaates Thüringen geprüft und genehmigt.

Der gesamte Versuchsablauf von der terminierten Verpaarung bis hin zu den akuten Isolationsversuchen wurden auf Grund der langen Zeitspanne, sowie der Komplexität und Variation der verschiedenen Aufgabenbereiche von einem Team bestehend aus Humanmedizinerinnen, Veterinärmedizinerinnen sowie Tierpflegern realisiert.

## 4.2 Versuchsabschnitt A

### 4.2.1 Terminierte Verpaarung

Insgesamt wurden 20 nicht-trächtige Schafe der Rasse Merino-Langwollschaf (Alter zwei bis sechs Jahre) einer Hormonbehandlung unterzogen. Diese bestand in der Gabe von 20mg Chronogest Schwämmchen (Flugeston®, Intervet, Beaucauze Cedex, Frankreich) über 14 Tage. Am 14. Tag erhielten die Schafe 500IU Pferdeserum-Gonadotropin (Intergonan® 240IE/ml, Intervet GmbH, Berlin). Nach einem Zeitintervall von 36 bis 48 Stunden nach dieser Gabe wurden die Schafe mit verschiedenen Böcken verpaart. Die Terminierung der Verpaarung erlaubte eine sichere Aussage über das Gestationsalter. Die Feststellung der Trächtigkeit erfolgte über die Messung des Progesteronspiegels am 18. Gestationstag. Anschließend wurden die trächtigen Tiere in zwei Kontrollgruppen randomisiert, eine frühe und eine späte Kontrollgruppe. Die zeitliche Angabe (frühe und späte Kontrollgruppe) gibt Auskunft darüber, an welchem Gestationstag die Muttertiere chirurgisch instrumentiert und anschließend dem akuten Isolationsstress ausgesetzt wurden.

Bis zum Zeitpunkt der chirurgischen Instrumentierung und den sich anschließenden Isolationsversuchen durchliefen alle Kontrolltiere eine vergleichbar physiologische Schwangerschaft.

Der Transport vom Freiland in die Versuchsräume erfolgte am 100.  $\pm$  2 Gestationstag für die frühe Kontrollgruppe und am 120.  $\pm$  2 Gestationstag für die späte Kontrollgruppe. Die Muttertiere wurden daraufhin bei konstanter Raumtemperatur von 20°C, relativer Luftfeuchte von 50% und einem festen Hell-Dunkel-Zyklus (12 Stunden Licht zwischen 07:00 und 19:00 Uhr, 12 Stunden Dunkelheit) gehalten. Die Versorgung der Tiere war an den natürlichen Bedarf einer Schwangerschaft angepasst. Futter wurde ad libitum zur Verfügung gestellt.

### 4.3 Versuchsabschnitt B

#### 4.3.1 Operative Instrumentierung

Nach einer fünftägigen Gewöhnungsphase an die neue Umgebung erfolgte die operative Instrumentierung des Feten und des Muttertieres. Die Nahrungskarenz vor der Operation betrug jeweils 24 Stunden. Die Operation fand in Abhängigkeit von der zugeordneten Gruppe am 104.  $\pm$  2 Gestationstag (frühe Kontrollgruppe) oder am 124.  $\pm$  2 Gestationstag (späte Kontrollgruppe) statt.

Im Zuge der Prämedikation erfolgte eine Sedierung mit 10 bis 15mg/kg Körpergewicht Ketamin intramuskulär (Ketamin-Hydrochlorid®, Pfizer Pharmacia GmbH, Berlin) und 0,2mg/kg Körpergewicht Midazolam (Midazolam-Hameln®, Hameln Pharmaceuticals, Hameln). Nach erfolgreicher Intubation der Schafe wurde die Narkose bei 100% sO<sub>2</sub> mit 1,5 Vol.-% Isofluran (Isofluran-Actavis®, Actavis GmbH, Langenfeld) aufrechterhalten. Zusätzlich erhielten die trächtigen Tiere während der Operation Corneregel Fluid® (Bausch & Lomb, Berlin) und Isotonische Kochsalzlösung® (Fresenius Kabi, Bad Homburg) als Volumentherapie. Über die Einlage von zwei Kathetern (PVC glasklar, Durchmesser 1mm) wurden die Muttertiere instrumentiert. Ein Katheter in der rechten Vena jugularis externa diente vor allem der postoperativen Infektionsprophylaxe. Über einen zweiten Katheter, der in die Arteria carotis communis eingeführt wurde, konnten sowohl Blutproben gewonnen als auch der arterielle Blutdruck aufgezeichnet werden. Zur Messung des UBF wurde zusätzlich eine Ultraschallsonde (Animal Blood Flowmeter T 206, Transonic Systems, Ithaca, USA) um eine Arteria uterina platziert. Der UBF beschreibt das Volumen pro Zeiteinheit (ml/min), welches eine Arteria uterina passiert.



Zur Instrumentierung der Feten war eine Laparotomie und Hysterotomie des Muttertieres unter sterilen Bedingungen nötig. Um hierbei die intrauterinen Bedingungen für alle Feten gleich zu gestalten, wurden die kleineren Feten bei Zwillingschwangerschaften aus dem Uterus entnommen und mittels 50mg/kg KG Pentobarbital (Pentobarbital-Natrium®, i.v., Narcoren, Merial, Hallbergmoos) eingeschläfert. Die Bestimmung der Größe der Feten erfolgte intrauterin mit Hilfe der Scheitel-Steiß-Länge.

Die Feten wurden mit drei Kathetern instrumentiert. Dabei wurde ein Katheter über die linke Arteria carotis communis in der Aorta ascendens platziert um den fetalen Blutdruck zu messen und die Entnahme von Blutproben zu ermöglichen. Die fetale Herzfrequenz wurde aus dem fetalen Blutdruck abgeleitet. Um eine Applikation von Medikamenten zu ermöglichen, wurde ein zweiter Katheter über die linke Vena jugularis externa in die Vena cava anterior (entspricht der humanen Vena cava superior) vorgeschoben. Zur postoperativen Antibiotikaprophylaxe und zur Korrektur des fetalen Blutdruckes mit Hilfe des hydrostatischen Druckes (entspricht dem Amniondruck) wurde ein dritter Katheter in die Amnionhöhle eingeführt. Nach erfolgreicher Platzierung aller Katheter gelangte der Fetus zurück in den Uterus.

Die fetalen Katheter wurden aus dem Uterus und der Abdominalhöhle über die seitliche Bauchwand ausgeleitet und sowohl Uterus als auch Abdomen mittels chirurgischer Nähte verschlossen. Die Durchgängigkeit der Katheter konnte durch Heparin-Infusion mit 12,5UI/ml und 0,5ml/h (Heparin-Natrium 5000IE/ml®, Rotexmedica GmbH, Trittenau) gewährleistet werden.

Nach der Operation wurden die Schafe in Boxen zurück in die oben beschriebenen Räume verschoben. Die postoperative Infektionsprophylaxe für Mutter und Feten bestand in der Gabe von 10mg/kg/12 Stunden Ampicillin (Ampicillin-Natrium®, Ratiopharm GmbH, Ulm) über drei Tage.

Für die analgetische Therapie wurden 1-4 g/24 Stunden Metamizol (Metamizol-WDT®, WDT, Garbsen) gewichtsadaptiert (30-50 mg/kg) infundiert.

Zudem erfolgte eine tägliche Kontrolle der mütterlichen und fetalen Blutgase, um den Gesundheitszustand der Tiere engmaschig zu überwachen.

#### **4.3.2 Protokoll zum akuten Isolationsversuch**

Nach der operativen Instrumentierung wurden die Muttertiere der frühen Kontrollgruppe ( $n = 10$ ) am  $110. \pm 2$  Gestationstag einem akuten Isolationsversuch unterzogen. Die Isolationsversuche der späten Kontrollgruppe ( $n = 10$ ) erfolgten am  $130. \pm 2$  Gestationstag.

Einige Muttertiere der späten Kontrollgruppe wurden am  $132. \pm 2$  und am  $134. \pm 2$  Gestationstag weiteren Isolationsversuchen unterzogen, die mit einer vorherigen Medikamentengabe einhergingen.

##### **4.3.2.1 Nativer Isolationsversuch**

Um etwaigen Stress vor dem Isolationsversuch zu verhindern, befanden sich die Schafe nach der chronischen Instrumentierung für mindestens drei Tage gemeinsam mit mindestens zwei weiteren Tieren in einem Versuchslabor. Jedes Tier stand dabei in einer fahrbaren Hochbox. Mit Beginn des Isolationsversuches wurde das Mutterschaf in der Hochbox in ein zweites Versuchslabor gebracht. Hier bestand weder visueller, noch akustischer oder sensorischer Kontakt zu den anderen Schafen. Die Dauer der Isolation beschränkte sich auf 120 Minuten. Währenddessen wurden Blutproben des Muttertieres und des Feten zu bestimmten Zeitpunkten entnommen:

1. Baseline (vor der Isolation);
2. nach zwei Minuten (direkt nach Isolation in das zweite Versuchslabor);
3. nach 15 Minuten;
4. nach 60 Minuten;
5. nach 120 Minuten.

Die Blutgasanalyse beinhaltete die Bestimmung von pH-Wert, Base Excess,  $p\text{CO}_2$ ,  $p\text{O}_2$  und  $s\text{O}_2$ . Dafür wurde eine arterielle Blutentnahme in 1ml Monovetten mit Ethylendiamintetraessigsäure (S-Monovette EDTA, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) benötigt. Die Bestimmung wurde mittels „ABL600, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark; Temperaturkorrektur auf  $39^\circ\text{C}$ “ sofort durchgeführt. Die Bestimmung der Glukose- und Laktatspiegel sowie der Kortisolspiegel erfolgte zeitnah im „Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik“ des Universitätsklinikums Jena unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Kiehntopf. Die

übrigen Blutproben wurden ohne Zeitverzögerung zentrifugiert und bei -80°C bis zur Bestimmung von Kortisol und Noradrenalin gelagert.

Zusätzlich wurden mindestens 20 Minuten vor (Baseline) und die übrigen 120 Minuten während des Isolationsversuches die folgenden Parameter des Muttertieres und des Feten nach Digitalisierung mit einem AD Wandler auf einem Computer mit Hilfe des Programmes „Windaq“ aufgezeichnet: UBF (in ml/min), Blutdruck (in mmHg), Amniondruck (in mmHg) und Herzfrequenz (in bpm).

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Computerprogramm „LabChart®7 Pro“ (ADInstruments, Spechbach, Deutschland).

#### 4.3.2.2 Isolationsversuche unter sympathoadrenerger Blockade

Bei einigen Muttertieren der späten Kontrollgruppe (n=10) wurde der Isolationsversuch nach der Gabe des  $\alpha_1$ - und  $\beta_{1,2}$ -Adrenorezeptor-Antagonisten, Labetalol, am 132.  $\pm$  2 Gestationstag wiederholt. Hierbei wurde dem Muttertier vor der Isolation über 30 Minuten Labetalol (1mg/kg, Labetalol-Hydrochloride®, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) infundiert. Die Aufzeichnung von UBF, Blutdruck und Herzfrequenz erfolgte über den gesamten Versuchsablauf, wie in den oben genannten Versuchen, inklusive einer Baseline vor und während der Labetalolgabe. Mit Beendigung der Infusion wurde das Tier von den übrigen Schafen isoliert. Der Versuchsablauf setzte sich von hier an identisch zum nativen Isolationsversuch fort.

Ein analoger Versuchsablauf wurde unter der Gabe von Urapidil (10 mg als Bolus und anschließend 4 mg/h; Urapidil i.v. 50®, Altana Pharma, Konstanz, Deutschland), einem ausschließlichen  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor-Antagonisten, an einigen Muttertieren der späten Kontrollgruppe (n=9) am 134.  $\pm$  2 Gestationstag ein drittes Mal durchgeführt.

#### 4.4 Kortisol- und Katecholaminbestimmung

Zur Bestimmung des mütterlichen und des fetalen Noradrenalinspiegels wurde die Methode der Flüssiggaschromatografie mit Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) durch das medizinische Labor Bremen unter der ärztlichen Leitung von Herrn Prof. Dr.med. W. N. Kühn-Velten angewandt. Bei diesem Verfahren werden Katecholamine aus Plasmaproben extrahiert und auf Borsäure-Gel-Platten (AffiGel601, BioRad, München, Deutschland) zusammen mit deuteriertem Noradrenalin-d<sub>6</sub> (TRC/LGC Promochem, Wesel, Deutschland), das als interner Standard gilt, angereichert. Die Elution erfolgte mittels 0,75 mmol/l Ethansäure. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand isokratisch auf eine Pentafluorphenyl-Säule eluiert (Agilent 1260 LC). Anschließend erfolgte die Ionisierung mittels eines Elektrosprays. Somit war eine Detektion und Quantifizierung von bestimmten Ionenfragmenten in einem API5500 Triple-Quadrupole Massenspektrometer (Applied Biosystems/Sciex, Darmstadt, Deutschland) möglich. Die Detektionsgrenze der Methode lag bei 5ng/l Noradrenalin (Retentionszeit 0,7 Minuten). Der Variationskoeffizient betrug 3,9%.

Die Kortisolspiegel im mütterlichen und fetalen Blut wurden mittels Radioimmunassay (RIA; DPC Coat-A-Count Radioimmunassay, Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA) entsprechend dem Herstellerprotokoll bestimmt. Das Detektionslimit der RIA betrug 5,5nmol/l.

Sowohl die Katecholamin- als auch die Kortisolspiegel wurden analog zu den Blutgasen bei den frühen und späten Kontrollgruppen zu den oben genannten Zeitpunkten (Baseline, zwei Minuten, 15 Minuten, 60 Minuten, 120 Minuten) bestimmt.

## 4.5 Statistische Analysen

Als statistisches Verfahren für den Vergleich von mütterlichen und fetalen Vitalitätsparametern sowie Blutgasen und Stresshormonen in den verschiedenen Versuchsgruppen wurde ein linear gemischtes Modell verwendet (Wang und Goonewardene 2004). Dieses Modell berücksichtigt sowohl feste Effekte, welche auf alle Individuen wirken, als auch zufällige Effekte. Letztere beziehen sich auf interindividuelle Unterschiede. Zudem erlaubt das oben genannte innovative Modell das Fehlen einzelner Messwerte. Linear gemischte Modelle weisen insgesamt eine geringere Bias bei gleichzeitig stärkerer statistischer Aussagekraft auf als konventionelle statistische Tests (Wang und Goonewardene 2004).

Die Berechnung erfolgte mittels SPSS 20.0 (IBM, New York, NY, USA). Hierbei wurden der genaue Messzeitpunkt als fester Effekt und Herzfrequenz, Blutdruck, UBF, Blutgase, sowie Kortisol und Noradrenalin als abhängige Variablen angenommen. Das Signifikanzniveau wurde bei  $\alpha < 0,05$  angesetzt und die Kovarianzstruktur wurde abhängig vom "Akaike Informationskriterium" ausgewählt (Wang und Goonewardene 2004).

Die Darstellung der Daten erfolgt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.).

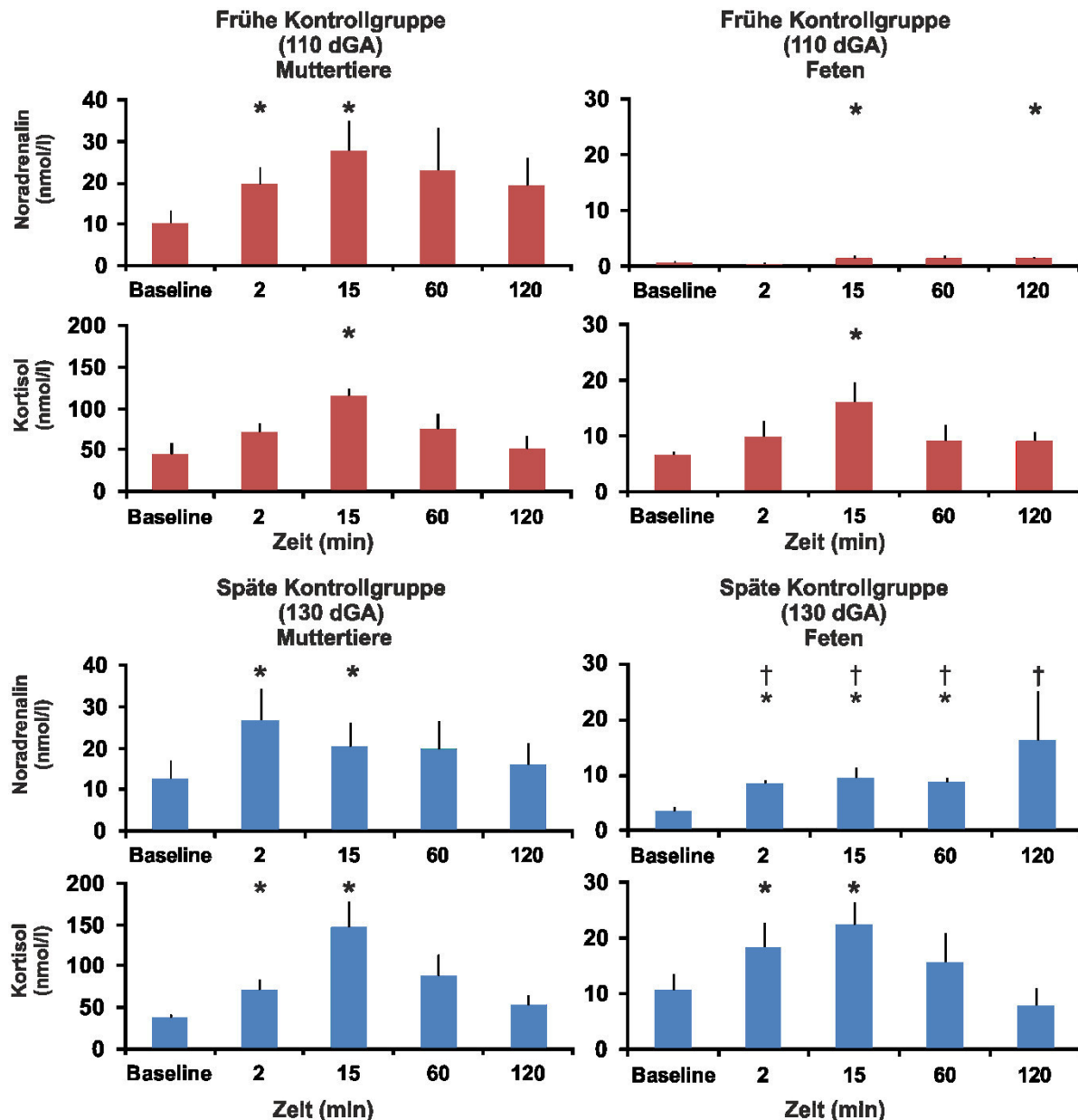
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Akute mütterliche Stressantwort

#### 5.1.1 Stresshormone der Muttertiere während der Isolation

Die Noradrenalin- und Kortisolspiegel unter Ausgangsbedingungen sowie die Anstiege von Noradrenalin und Kortisol während des Isolationsstresses waren zwischen den Muttertieren der frühen und späten Kontrollgruppe nicht unterschiedlich.

Bei den Muttertieren der frühen Kontrollgruppe erhöhte sich der Plasma-Noradrenalin Spiegel von  $10,2 \pm 2,0$  nmol/l auf ein Maximum von  $27,9 \pm 7,0$  nmol/l nach 15-minütigem Isolationsstress ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 2). Bei den Muttertieren der späten Kontrollgruppe erhöhte sich der Noradrenalin Spiegel im Plasma von  $12,7 \pm 4,5$  nmol/l auf ein Maximum von  $26,8 \pm 7,6$  nmol/l 15 Minuten nach Isolationsbeginn ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 2). Ebenso erhöhten sich die mütterlichen Kortisolspiegel von  $49,0 \pm 13$  nmol/l auf ein Maximum von  $115,0 \pm 9$  nmol/l in der frühen Kontrollgruppe sowie von  $37,2 \pm 3,4$  nmol/l auf ein Maximum von  $146,5 \pm 31,1$  nmol/l in der späten Kontrollgruppe nach 15-minütigem Isolationsstress ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Noradrenalin- und Kortisolspiegel der Muttertiere und Feten der frühen Kontrollgruppe (n = 10, rot) und der späten Kontrollgruppe (n = 10, blau), \* p < 0,05 vgl. zu Baseline vor Isolation; (\*) p < 0,1 vgl. zu Baseline vor Isolation; **Beachte späteren bzw. prolongierten Noradrenalinanstieg bei den Feten verglichen zu den Muttertieren!**

### 5.1.2 Blutgase und metabolische Parameter der Muttertiere während der Isolation

pH-Wert, Base Excess, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, sO<sub>2</sub> sowie Blutglukose- und Laktatspiegel waren unter Ausgangsbedingungen bei den Muttertieren der frühen und späten Kontrollgruppe nicht unterschiedlich. Außerdem traten während der Isolation in beiden Gruppen keine wesentlichen Veränderungen der Blutgase (pH-Wert, Base Excess,

pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, sO<sub>2</sub>) auf, bis auf eine transiente Erniedrigung des mütterlichen pCO<sub>2</sub> bei gleichzeitigem Anstieg des pO<sub>2</sub> in der späten Kontrollgruppe unmittelbar nach Isolationsbeginn, welche am ehesten einer durch Isolation bedingten Hyperventilation zuzuschreiben ist (siehe 6.2.1.2). Dabei fiel der mütterliche pCO<sub>2</sub> von 32,0 ± 0,8 mmHg auf 27,7 ± 1,2 mmHg (p < 0,05; siehe Tabelle 1) bei gleichzeitigem Anstieg des pO<sub>2</sub> von 96,7 ± 3,2 mmHg auf 116,4 ± 7,3 mmHg etwa zwei Minuten nach Isolationsbeginn (p < 0,05; siehe Tabelle 1).

Mit Isolationsbeginn stieg der mütterliche Laktatspiegel im Blutplasma in der frühen Kontrollgruppe von 0,8 ± 0,2 mmol/l auf ein Maximum von 1,5 ± 0,3 mmol/l nach 15-minütiger Isolation und war hier im Vergleich zur späten Kontrollgruppe höher (p < 0,05; siehe Tabelle 1). In der späten Kontrollgruppe stieg der mütterliche Laktatspiegel im Blutplasma transient von 0,5 ± 0,1 mmol/l auf 0,8 ± 0,1 mmol/l unmittelbar nach Isolationsbeginn (p < 0,05; siehe Tabelle 1).

Die mütterlichen Blutglukosespiegel stiegen während des Isolationsversuches in der frühen Kontrollgruppe von 3,2 ± 0,5 mmol/l auf ein Maximum von 3,7 ± 0,4 mmol/l, sowie in der späten Kontrollgruppe von 2,3 ± 0,3 mmol/l auf ein Maximum von 3,0 ± 0,5 mmol/l nach 15-minütiger Isolation (p < 0,05, siehe Tabelle 1). Zu diesem Zeitpunkt war der mütterliche Blutglukosespiegel in der frühen Kontrollgruppe höher als in der späten (p < 0,05; siehe Tabelle 1).

|          | ph          | Base Excess | pCO <sub>2</sub> (mmHg) | pO <sub>2</sub> (mmHg) | O <sub>2</sub> -Sat. (%) | Glucose (mmol.L <sup>-1</sup> ) | Lactat (mmol.L <sup>-1</sup> ) |
|----------|-------------|-------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Baseline | 7,52 ± 0,02 | 1,7 ± 1,6   | 31,1 ± 1,8              | 105,7 ± 4,9            | 99,9 ± 0,1               | 3,2 ± 0,5                       | 0,8 ± 0,2                      |
| 0        | 7,51 ± 0,01 | 2,9 ± 0,9   | 31,1 ± 1,8              | 107,0 ± 9,2            | 100,2 ± 0,2              | 3,4 ± 0,4                       | 0,9 ± 0,2                      |
| 15       | 7,52 ± 0,01 | 2,3 ± 0,8   | 30,9 ± 1,3              | 103,4 ± 4,7            | 100,0 ± 0,2              | 3,7 ± 0,4 *                     | 1,5 ± 0,3 *                    |
| 60       | 7,52 ± 0,01 | 3,5 ± 0,7   | 30,9 ± 0,9              | 99,0 ± 2,8             | 99,8 ± 0,5               | 3,7 ± 0,4 (*)                   | 1,0 ± 0,2                      |
| 120      | 7,51 ± 0,01 | 3,0 ± 1,2   | 30,9 ± 1,6              | 105,9 ± 4,7            | 100,0 ± 0,2              | 3,5 ± 0,3                       | 0,9 ± 0,2                      |

|          | ph          | Base Excess  | pCO <sub>2</sub> (mmHg) | pO <sub>2</sub> (mmHg) | O <sub>2</sub> -Sat. (%) | Glucose (mmol.L <sup>-1</sup> ) | Lactat (mmol.L <sup>-1</sup> ) |
|----------|-------------|--------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Baseline | 7,48 ± 0,01 | 1,1 ± 0,7    | 32,0 ± 0,8              | 96,7 ± 3,2             | 99,7 ± 0,2               | 2,3 ± 0,3                       | 0,5 ± 0,1                      |
| 0        | 7,50 ± 0,01 | -0,4 ± 0,9 † | 27,7 ± 1,2 * †          | 116,4 ± 7,3 *          | 100,0 ± 0,0              | 2,6 ± 0,4                       | 0,8 ± 0,1 *                    |
| 15       | 7,50 ± 0,01 | -0,2 ± 1,0   | 28,2 ± 1,4 *            | 97,3 ± 2,9             | 100,0 ± 0,0              | 3,0 ± 0,5 *                     | 0,9 ± 0,2 (*) †                |
| 60       | 7,50 ± 0,01 | 1,2 ± 0,8    | 30,4 ± 0,7              | 101,1 ± 4,5            | 99,9 ± 0,1               | 2,4 ± 0,2 * †                   | 0,5 ± 0,1                      |
| 120      | 7,50 ± 0,01 | 1,8 ± 0,9    | 31,3 ± 1,0              | 102,1 ± 5,8            | 99,8 ± 0,2               | 2,8 ± 0,5                       | 0,5 ± 0,1                      |

**Tabelle 1:** Blutgase und metabolische Parameter der Muttertiere der frühen (n = 10, obere Tabelle) und der späten (n = 10, untere Tabelle) Kontrollgruppe, \* p < 0,05 vgl. zu Baseline vor Isolation; (\*) p < 0,1 vgl. zu Baseline vor Isolation, † p < 0,05 vgl. zu Muttertieren der frühen Kontrollgruppe



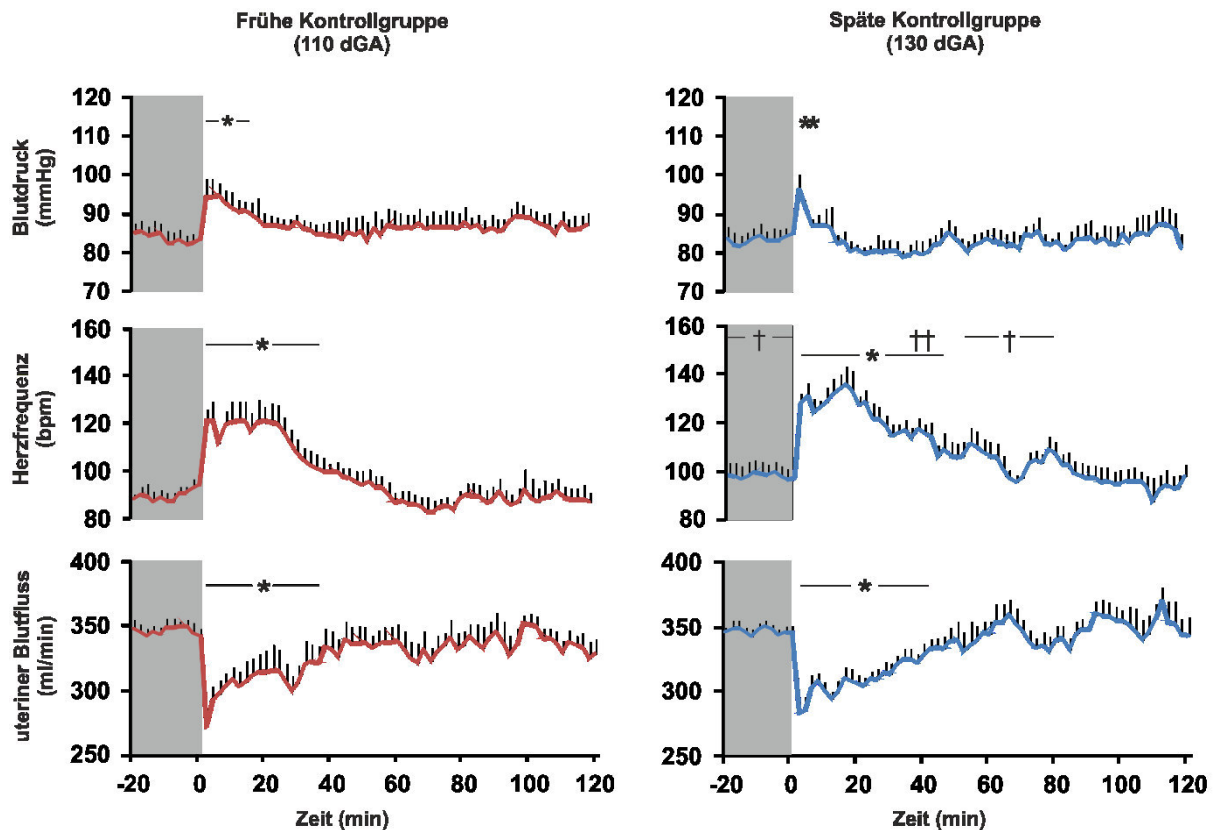
### 5.1.3 Kardiovaskuläre Parameter der Muttertiere während der Isolation

Bezüglich des mütterlichen Blutdruckes unter Ausgangsbedingungen zeigten sich keine Unterschiede zwischen der frühen und späten Kontrollgruppe. Mit Isolationsbeginn war der Blutdruckanstieg in beiden Gruppen ähnlich. So stieg der mütterliche Blutdruck in der frühen Kontrollgruppe von  $84 \pm 3$  mmHg auf ein Maximum von  $95 \pm 3$  mmHg sowie in der späten Kontrollgruppe von  $83 \pm 3$  mmHg auf ein Maximum von  $96 \pm 4$  mmHg ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 3). Der Blutdruckanstieg war in der frühen Kontrollgruppe mit 14 Minuten tendenziell länger als in der späten Kontrollgruppe mit vier Minuten.

Die mütterliche Herzfrequenz war in der frühen Kontrollgruppe unter Ausgangsbedingungen um durchschnittlich 9 bpm niedriger als in der späten Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 3). Unter Isolationsbedingungen stieg die mütterliche Herzfrequenz in der frühen Kontrollgruppe von  $90 \pm 4$  bpm auf ein Maximum von  $121 \pm 7$  bpm für 36 Minuten an ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 3). Der Herzfrequenzanstieg in der späten Kontrollgruppe von  $98 \pm 5$  mmHg auf ein Maximum von  $136 \pm 7$  mmHg verlief nach Isolationsbeginn ähnlich, dauerte hier allerdings mit 46 Minuten signifikant länger an als in der frühen Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 3).

### 5.1.4 Uteriner Blutfluss während der Isolation

Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Intensität und Dauer des UBF-Abfalls zwischen den Muttertieren der frühen und späten Kontrollgruppe. Der UBF fiel in der frühen Kontrollgruppe mit Beginn der Isolation um maximal 21 % von  $346 \pm 6$  ml/min auf  $272 \pm 13$  ml/min über 36 Minuten ab ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 3). In der späten Kontrollgruppe sank der UBF mit Beginn der Isolation um maximal 18 % von  $346 \pm 4$  ml/min auf  $282 \pm 10$  ml/min über 40 Minuten ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Blutdruck, Herzfrequenz und UBF der Muttertiere der frühen Kontrollgruppe (n = 10, rot) und der späten Kontrollgruppe (n = 10, blau); \* p < 0,05 vgl. zu Baseline vor Isolation, † p < 0,05 vgl. zu Muttertieren der frühen Kontrollgruppe

## 5.2 Akute fetale Stressantwort

### 5.2.1 Stresshormone der Feten während der Isolation

Der Noradrenalin Spiegel im Blutplasma der Feten der frühen Kontrollgruppe stieg 15 Minuten nach Isolationsbeginn von  $0,6 \pm 0,1$  nmol/l auf ein Maximum von  $1,4 \pm 0,4$  nmol/l an und blieb über den gesamten Isolationsversuch erhöht (p < 0,05; siehe Abbildung 2). Bei den Feten der späten Kontrollgruppe betrug der Plasma-Noradrenalin Spiegel unter Ausgangsbedingungen  $3,5 \pm 0,7$  nmol/l. Er stieg bereits zwei Minuten nach Isolationsbeginn auf den Maximalwert von  $9,6 \pm 1,8$  nmol/l und blieb für weitere 60 Minuten erhöht (p < 0,05; siehe Abbildung 2).

Der fetale Kortisol Spiegel stieg in der frühen Kontrollgruppe von  $6,5 \pm 0,7$  nmol/l auf ein Maximum von  $16,2 \pm 3,3$  nmol/l sowie in der späten Kontrollgruppe von  $10,6 \pm 2,9$  nmol/l auf  $22,4 \pm 4,0$  nmol/l nach 15-minütigem Isolationsstress und fiel anschließend wieder ab (p < 0,05; siehe Abbildung 2).

Die fetalen Noradrenalin Spiegel unter Ausgangsbedingungen unterschieden sich zwischen der frühen und der späten Kontrollgruppe nicht. Allerdings war der relative und absolute Noradrenalinanstieg bei den Feten der späten Kontrollgruppe über den gesamten Isolationsversuch höher als bei den Feten der frühen Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 2).

Die fetalen Kortisol Spiegel unter Ausgangsbedingungen waren in der späten Kontrollgruppe tendenziell höher, als in der frühen Kontrollgruppe (siehe Abbildung 2). Der fetale Kortisolanstieg während der Isolation unterschied sich zwischen früher und später Kontrollgruppe nicht.

### **5.2.2 Blutgase und metabolische Parameter der Feten während der Isolation**

Der pH-Wert fiel in der frühen (von  $7,40 \pm 0,01$  auf  $7,34 \pm 0,03$ ) und in der späten Kontrollgruppe (von  $7,39 \pm 0,01$  auf  $7,36 \pm 0,01$ ) kontinuierlich bis zum Ende des Isolationsversuches ab ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,1$ ; siehe Tabelle 2). Allerdings stieg der fetale pH-Wert in der frühen Kontrollgruppe transient von  $7,40 \pm 0,01$  auf  $7,43 \pm 0,00$  zu Beginn der Isolation ( $p < 0,05$ ; siehe Tabelle 2). Analog dazu fiel der fetale Base Excess in der frühen Kontrollgruppe von  $-0,6 \pm 0,6$  mmol/l auf ein Minimum von  $-10,0 \pm 4,5$  mmol/l sowie in der späten Kontrollgruppe von  $0,2 \pm 0,5$  auf ein Minimum von  $-3,7 \pm 1,8$  nach 120-minütiger Isolationsphase ab ( $p < 0,05$ ; siehe Tabelle 2).

Während sich die übrigen Blutgase bei den Feten der frühen Kontrollgruppe während der Isolation nicht änderten, fielen bei den Feten der späten Kontrollgruppe  $p\text{CO}_2$ ,  $p\text{O}_2$  und  $s\text{O}_2$  nach 15-minütiger Isolation ab und blieben danach konstant niedriger ( $p < 0,05$ ; siehe Tabelle 2).

Der Laktat Spiegel im Blutplasma der Feten der frühen Kontrollgruppe stieg über den gesamten Isolationsversuch von  $1,1 \pm 0,1$  mmol/l auf  $1,3 \pm 0,1$  mmol/l leicht an ( $p < 0,05$ , siehe Tabelle 2). Auch in der späten Kontrollgruppe stieg der fetale Laktat Spiegel von  $1,5 \pm 0,2$  mmol/l auf ein Plateau von  $1,7 \pm 0,2$  mmol/l nach 60-minütiger Isolation, was bis zum Ende des Isolationsversuches anhielt ( $p < 0,05$ , siehe Tabelle 2). Die fetalen Blutglukosespiegel blieben in beiden Kontrollgruppen während der Isolation unverändert.

Sowohl der pH-Wert, der Base Excess und der pCO<sub>2</sub> als auch der Laktatspiegel der Feten waren zwischen früher und später Kontrollgruppe weder unter Ausgangsbedingungen noch während der Isolation unterschiedlich. Allerdings war bei den Feten der späten Kontrollgruppe der pO<sub>2</sub> und die sO<sub>2</sub> ab der 60. Minute nach Isolationsbeginn niedriger im Vergleich zu den Feten der frühen Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ , siehe Tabelle 2). Auch der Blutglukosespiegel war in der späten Kontrollgruppe sowohl unter Ausgangsbedingungen als auch während des gesamten Isolationsversuches niedriger als in der frühen Kontrollgruppe ( $p > 0,05$ , siehe Tabelle 2).

|          | ph              | Base Excess   | pCO <sub>2</sub> (mmHg) | pO <sub>2</sub> (mmHg) | O <sub>2</sub> -Sättigung (%) | Glucose (mmol.L <sup>-1</sup> ) | Lactat (mmol.L <sup>-1</sup> ) |
|----------|-----------------|---------------|-------------------------|------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Baseline | 7,40 ± 0,01     | -0,6 ± 0,6    | 37,9 ± 2,07             | 22,8 ± 1,0             | 75,9 ± 1,8                    | 1,0 ± 0,2                       | 1,1 ± 0,1                      |
| 2        | 7,43 ± 0,00 *   | -0,8 ± 1,7    | 35,4 ± 2,74             | 24,8 ± 1,1             | 78,9 ± 1,2                    | 1,1 ± 0,2                       | 1,4 ± 0,2 (*)                  |
| 15       | 7,41 ± 0,02     | -2,6 ± 2,4    | 35,4 ± 2,56             | 23,7 ± 2,2             | 74,6 ± 2,2                    | 1,2 ± 0,2                       | 1,3 ± 0,1 *                    |
| 60       | 7,37 ± 0,04     | -5,9 ± 3,6    | 34,7 ± 2,48             | 25,7 ± 2,8             | 76,3 ± 2,8                    | 1,0 ± 0,2                       | 1,4 ± 0,1                      |
| 120      | 7,34 ± 0,03 (*) | -10,0 ± 4,5 * | 36,5 ± 2,34             | 24,9 ± 1,3             | 74,8 ± 2,4                    | 1,1 ± 0,3                       | 1,3 ± 0,1 (*)                  |

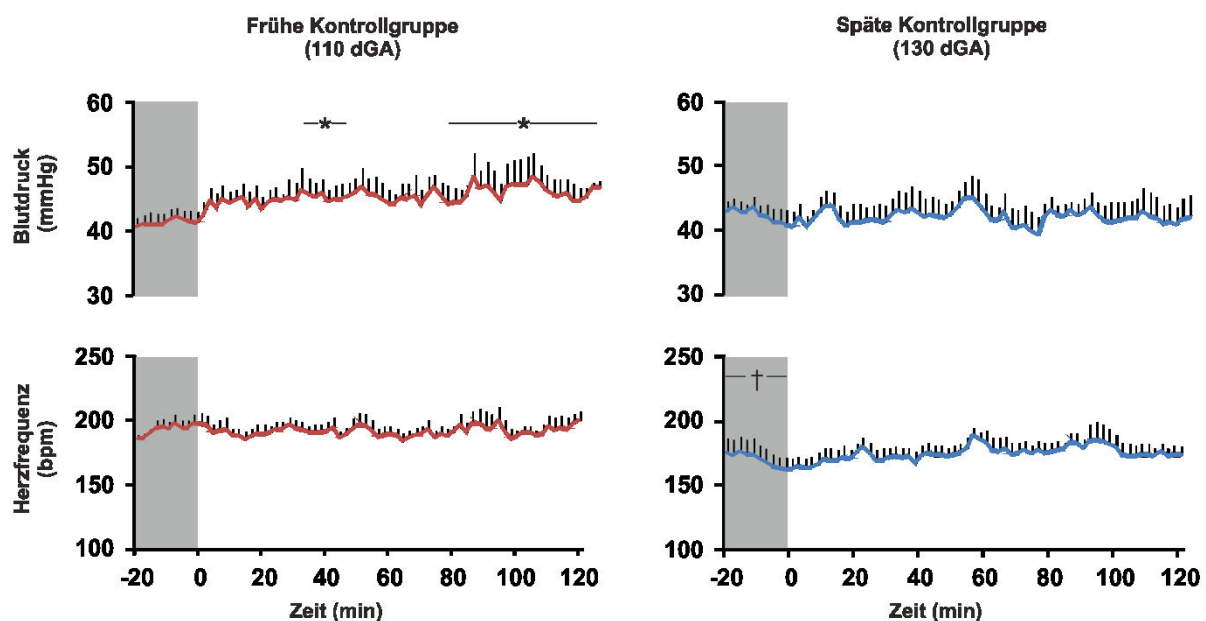
|          | ph            | Base Excess  | pCO <sub>2</sub> (mmHg) | pO <sub>2</sub> (mmHg) | O <sub>2</sub> -Sättigung (%) | Glucose (mmol.L <sup>-1</sup> ) | Lactat (mmol.L <sup>-1</sup> ) |
|----------|---------------|--------------|-------------------------|------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Baseline | 7,39 ± 0,01   | 0,2 ± 0,5    | 41,9 ± 0,7              | 22,0 ± 1,4             | 75,3 ± 2,5                    | 0,4 ± 0,0                       | † 1,5 ± 0,2                    |
| 2        | 7,40 ± 0,01   | -0,4 ± 0,8   | 41,0 ± 0,9 †            | 21,4 ± 1,5             | 72,5 ± 3,1                    | 0,5 ± 0,1                       | † 1,6 ± 0,2                    |
| 15       | 7,39 ± 0,01   | -1,6 ± 1,1   | 39,2 ± 2,5              | 20,2 ± 1,3 (*)         | 66,9 ± 5,6 *                  | 0,6 ± 0,1                       | † 1,6 ± 0,2                    |
| 60       | 7,37 ± 0,02   | -3,0 ± 1,3 * | 37,8 ± 1,5 *            | 19,8 ± 1,6 *†          | 64,4 ± 5,8 *†                 | 0,6 ± 0,1                       | † 1,7 ± 0,2 *                  |
| 120      | 7,36 ± 0,01 * | -3,7 ± 1,8 * | 40,3 ± 1,3              | 19,5 ± 1,1 *†          | 67,4 ± 3,6 *                  | 0,6 ± 0,1 (*)†                  | † 1,7 ± 0,2 *                  |

**Tabelle 2:** Blutgase und metabolische Parameter der Feten der frühen (n = 7, obere Tabelle) und der späten (n = 7, untere Tabelle) Kontrollgruppe, \*  $p < 0,05$  vgl. zu Baseline vor Isolation; (\*)  $p < 0,1$  vgl. zu Baseline vor Isolation, †  $p < 0,05$  vgl. zu Feten der frühen Kontrollgruppe

### 5.2.3 Kardiovaskuläre Parameter der Feten während der Isolation

Der Ausgangsblutdruck unterschied sich nicht zwischen den Feten der frühen und der späten Kontrollgruppe. Während der Blutdruck der Feten in der frühen Kontrollgruppe über den gesamten Isolationsversuch von  $42 \pm 2$  mmHg auf maximal  $49 \pm 4$  mmHg anstieg, änderte sich der fetale Blutdruck in der späten Kontrollgruppe nicht ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 4).

Die Herzfrequenz war bei den Feten der späten Kontrollgruppe unter Ausgangsbedingungen im Vergleich zu den Feten der frühen Kontrollgruppe um durchschnittlich 24 bpm niedriger ( $p < 0,05$ , siehe Abbildung 4). Während des Isolationsversuches blieb die fetale Herzfrequenz sowohl in der frühen als auch in der späten Kontrollgruppe unverändert (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Blutdruck und Herzfrequenz der Feten (frühe Kontrollgruppe:  $n = 7$ , rot; späte Kontrollgruppe:  $n = 7$ , blau); \*  $p < 0,05$  vgl. zu Baseline vor Isolation; †  $p < 0,05$  vgl. zu Feten der frühen Kontrollgruppe

### 5.3 Effekte einer kombinierten $\alpha_1$ - und $\beta_{1,2}$ -Adrenorezeptorblockade mittels Labetalol auf die Stressantwort der Muttertiere

#### 5.3.1 Blutgase und metabolische Parameter der Muttertiere während der Labetalolgabe und der nachfolgenden Isolation

Sowohl unter der Gabe von Labetalol als auch während der nachfolgenden Isolation kam es zu keiner signifikanten Änderung von pH-Wert, Base Excess,  $p\text{CO}_2$ ,  $p\text{O}_2$  und  $s\text{O}_2$  der Muttertiere (siehe Tabelle 3). Die mütterlichen Blutglukose- und Laktatspiegel stiegen nach Labetalolgabe von  $2,3 \pm 0,3$  mmol/l auf  $3,6 \pm 0,4$  mmol/l und von  $0,5 \pm 0,1$  mmol/l auf  $1,5 \pm 0,3$  mmol/l an ( $p < 0,05$ ; siehe Tabelle 3). Im Rahmen der nachfolgenden Isolation stieg der mütterliche Blutglukosespiegel über die gesamte Isolationsdauer auf ein Maximum von  $5,0 \pm 0,4$  mmol/l nach 120-minütiger Isolationsphase ( $p < 0,05$ ; siehe Tabelle 3). Auch der mütterliche Laktatspiegel stieg nach Isolationsbeginn über die gesamte Isolationsdauer an, wobei der Maximalwert von  $3,1 \pm 0,5$  mmol/l bereits zwei Minuten nach Isolationsbeginn erreicht war ( $p < 0,05$ ; siehe Tabelle 3).

Im Vergleich zur Isolation unter Kontrollbedingungen stieg der Blutglukose- und Laktatspiegel der Muttertiere während der Isolation unter Labetalol schneller und stärker an ( $p < 0,05$ ; siehe Tabelle 3), wobei sich das Niveau am Ende des Isolationsversuches nicht unterschied. Ebenso war der mütterliche Laktatspiegel unmittelbar nach Isolationsbeginn bei der Isolation unter Labetalol höher als bei der Isolation unter Kontrollbedingungen ( $p < 0,05$ ; siehe Tabelle 3).

|                          | pH              | Base Excess     | $p\text{CO}_2$ (mmHg) | $p\text{O}_2$ (mmHg) | $\text{O}_2$ -Sättigung (%) | Glucose (mmol.L <sup>-1</sup> ) | Lactat (mmol.L <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Baseline vor Labetalol   | $7,48 \pm 0,01$ | $1,1 \pm 0,71$  | $32,0 \pm 0,82$       | $96,7 \pm 3,17$      | $99,7 \pm 0,24$             | $2,3 \pm 0,3$                   | $0,5 \pm 0,1$                  |
| Baseline unter Labetalol | $7,48 \pm 0,01$ | $-0,4 \pm 0,76$ | $30,1 \pm 1,07$       | $103,8 \pm 5,84$     | $98,3 \pm 1,31$             | $3,6 \pm 0,4$ <sup>a</sup>      | $1,5 \pm 0,3$ <sup>a</sup>     |
| 2                        | $7,46 \pm 0,02$ | $-1,3 \pm 0,94$ | $28,8 \pm 0,91$       | $106,7 \pm 4,78$     | $97,1 \pm 2,70$             | $4,2 \pm 0,4$ <sup>b</sup> †    | $3,1 \pm 0,5$ <sup>b</sup> †   |
| 15                       | $7,48 \pm 0,02$ | $-1,1 \pm 1,12$ | $28,5 \pm 0,43$       | $101,7 \pm 3,59$     | $100,0 \pm 0,00$            | $4,7 \pm 0,4$ <sup>b</sup> †    | $3,0 \pm 0,9$ <sup>b</sup>     |
| 60                       | $7,47 \pm 0,01$ | $-1,5 \pm 1,15$ | $28,5 \pm 0,49$       | $104,7 \pm 3,52$     | $97,0 \pm 3,00$             | $5,0 \pm 0,4$ <sup>b</sup>      | $2,1 \pm 0,7$ <sup>b</sup>     |

**Tabelle 3:** Blutgase und metabolische Parameter der Muttertiere während der Isolation unter Labetalolgabe am 130. Gestationstag ( $n = 10$ ), <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vgl. zu Baseline vor Labetalol; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vgl. zu Baseline unter Labetalol, †  $p < 0,05$  vgl. zu Isolation unter Kontrollbedingungen am 130. Gestationstag (siehe Tabelle 1, untere Tabelle)

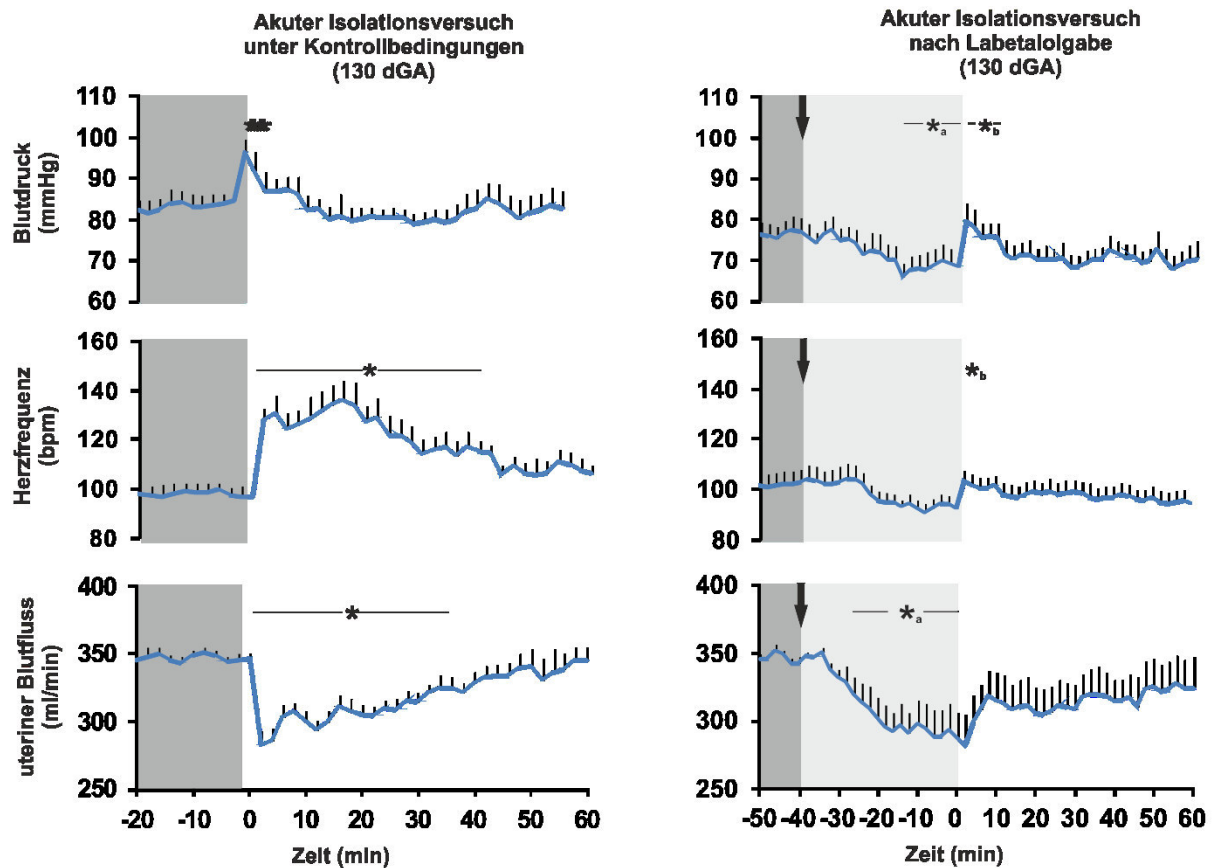
### **5.3.2 Kardiovaskuläre Parameter der Muttertiere während der Labetalolgabe und der nachfolgenden Isolation**

Der Blutdruck der Muttertiere fiel unter Labetalolinfusion kontinuierlich über 26 Minuten ab und stellte sich dann auf ein Plateau ein ( $76 \pm 3$  mmHg vs.  $68 \pm 3$  mmHg) ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 5). Mit Isolationsbeginn stieg der mütterliche Blutdruck von  $68 \pm 3$  mmHg über zehn Minuten auf maximal  $80 \pm 4$  mmHg an ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 5). Der relative Blutdruckanstieg nach Isolationsbeginn unter Labetalol war in seiner Dauer und Intensität im Vergleich zur Isolation unter Kontrollbedingungen ähnlich.

Die Herzfrequenz der Muttertiere fiel tendenziell unter Labetalolinfusion kontinuierlich über 26 Minuten auf ein Plateau ab ( $100 \pm 5$  bpm vs.  $92 \pm 3$  bpm) (siehe Abbildung 5). Mit Isolationsbeginn stieg die mütterliche Herzfrequenz transient über vier Minuten von  $92 \pm 3$  bpm auf  $103 \pm 4$  bpm an ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 5). Der relative Herzfrequenzanstieg nach Isolationsbeginn unter Labetalol war im Vergleich zur Isolation unter Kontrollbedingungen tendenziell geringer und kürzer.

### **5.3.3 Uteriner Blutfluss während der Labetalolgabe und der nachfolgenden Isolation**

Der UBF fiel unter Labetalolinfusion kontinuierlich über 14 Minuten auf ein Plateau ab ( $346 \pm 3$  ml/min vs.  $292 \pm 19$  ml/min) ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 5). Mit Isolationsbeginn kam es zu keiner Änderung des UBF über den gesamten Versuchsverlauf. Dies steht im Gegensatz zum prolongierten UBF-Abfall bei der Isolation unter Kontrollbedingungen (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Blutdruck, Herzfrequenz und UBF der Muttertiere während der Isolation unter Kontrollbedingungen (n = 10, links) und unter Labetalolgabe (n = 10, rechts) am 130. Gestationstag, \*  $p < 0,05$  vgl. zu Baseline vor Isolation; \*<sub>a</sub>  $p < 0,05$  vgl. zu Baseline vor Labetalol; \*<sub>b</sub>  $p < 0,05$  vgl. zu Baseline unter Labetalol; **Beachte tendenzieller Anstieg des UBF unter Labetalolgabe!**



## 5.4 Effekte einer $\alpha_1$ -Adrenorezeptorblockade mittels Urapidil auf die Stressantwort der Muttertiere

### 5.4.1 Blutgase und metabolische Parameter der Muttertiere während der Urapidilgabe und der nachfolgenden Isolation

Sowohl unter der Gabe von Urapidil als auch während der Isolation kam es zu keiner signifikanten Änderung von pH-Wert, Base Excess,  $p\text{CO}_2$ ,  $p\text{O}_2$ ,  $s\text{O}_2$  sowie Blutglukosespiegel der Muttertiere (siehe Tabelle 4). Der mütterliche Laktatspiegel blieb zwar unter Urapidilgabe konstant, stieg aber unmittelbar nach Isolationsbeginn von  $0,5 \pm 0,04$  mmol/l (unter Urapidil) auf ein Maximum von  $0,8 \pm 0,1$  mmol/l nach 15-minütiger Isolation ( $p < 0,05$ ; siehe Tabelle 4).

Im Vergleich zur Isolation unter Kontrollbedingungen war der  $p\text{CO}_2$  während der Isolation unter Urapidil über den gesamten Isolationsversuch höher ( $p < 0,05$ ; siehe Tabelle 4). pH-Wert, Base Excess,  $p\text{O}_2$ ,  $s\text{O}_2$ , sowie Blutglukose- und Laktatspiegel differierten zwischen der Isolation unter Kontrollbedingungen und der Isolation unter Labetalolgabe nicht.

|                         | pH              | Base Excess   | $p\text{CO}_2$ (mmHg)   | $p\text{O}_2$ (mmHg) | $\text{O}_2$ -Sättigung (%) | Glucose (mmol.L <sup>-1</sup> ) | Lactat (mmol.L <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------|-----------------|---------------|-------------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Baseline vor Urapidil   | $7,51 \pm 0,01$ | $2,2 \pm 0,7$ | $31,5 \pm 1,2$          | $103,0 \pm 2,9$      | $101,0 \pm 0,6$             | $2,7 \pm 0,8$                   | $0,6 \pm 0,1$                  |
| Baseline unter Urapidil | $7,49 \pm 0,01$ | $1,8 \pm 0,9$ | $33,2 \pm 1,3$          | $106,6 \pm 4,0$      | $101,0 \pm 0,5$             | $3,1 \pm 1,1$                   | $0,5 \pm 0,0$                  |
| 2                       | $7,50 \pm 0,01$ | $2,5 \pm 0,9$ | $33,0 \pm 1,4 \uparrow$ | $100,8 \pm 2,9$      | $100,5 \pm 0,7$             | $3,1 \pm 1,1$                   | $0,8 \pm 0,1^*$                |
| 15                      | $7,49 \pm 0,01$ | $1,4 \pm 1,1$ | $31,9 \pm 1,0 \uparrow$ | $104,3 \pm 4,3$      | $100,7 \pm 0,6$             | $3,2 \pm 1,0$                   | $0,6 \pm 0,0$                  |
| 60                      | $7,51 \pm 0,01$ | $2,7 \pm 1,0$ | $31,9 \pm 1,0 \uparrow$ | $101,5 \pm 5,5$      | $101,1 \pm 0,6$             | $3,2 \pm 1,2$                   | $0,6 \pm 0,0$                  |

**Tabelle 4:** Blutgase und metabolische Parameter der Muttertiere während der Isolation unter Urapidilgabe am 130. Gestationstag ( $n = 9$ ),  $^* p < 0,05$  vgl. zu Baseline unter Urapidil;  $\uparrow$  vgl. zu Isolation unter Kontrollbedingungen am 130. Gestationstag (siehe Tabelle 1, untere Tabelle)

### 5.4.2 Kardiovaskuläre Parameter der Muttertiere während der Urapidilgabe und der nachfolgenden Isolation

Der Blutdruck der Muttertiere fiel unter Urapidilinfusion kontinuierlich über 24 Minuten auf ein Plateau ( $89 \pm 3$  mmHg vs.  $79 \pm 6$  mmHg) ab ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 6). Die Herzfrequenz der Muttertiere änderte sich unter Urapidilinfusion nicht.

Mit Beginn der Isolation stieg der mütterliche Blutdruck über vier Minuten von  $79 \pm 5$  mmHg auf maximal  $99 \pm 8$  mmHg an ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 6). Der relative

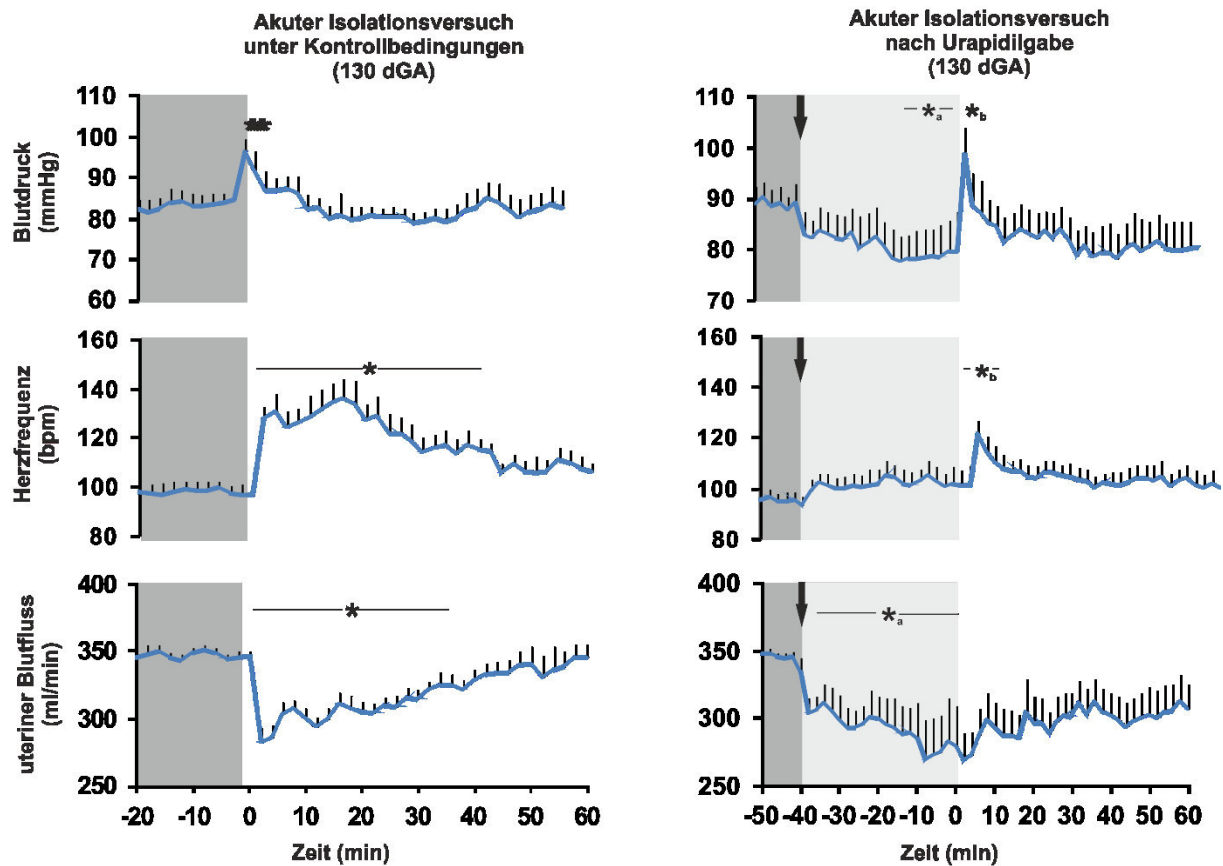
Blutdruckanstieg nach Isolationsbeginn unter Urapidil war bezüglich der Dauer und Intensität im Vergleich zur Isolation unter Kontrollbedingungen gleich.

Mit Beginn der Isolation stieg die mütterliche Herzfrequenz von  $102 \pm 6$  bpm auf maximal  $122 \pm 8$  bpm über sechs Minuten an ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 6).

Der relative Herzfrequenzanstieg nach Isolationsbeginn unter Urapidil war im Vergleich zur Isolation unter Kontrollbedingungen tendenziell geringer und kürzer (siehe Abbildung 6).

#### **5.4.3 Uteriner Blutfluss während der Urapidilgabe und der nachfolgenden Isolation**

Der UBF stellte sich nach Urapidilinfusion auf ein Plateau ein ( $346 \pm 3$  ml/min vs.  $277 \pm 29$  ml/min) ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 6). Mit Isolationsbeginn kam es zu keiner signifikanten Änderung des UBF, was im Gegensatz zum prolongierten Abfall des UBF bei der Isolation unter Kontrollbedingungen steht (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Blutdruck, Herzfrequenz und UBF der Muttertiere während der Isolation unter Kontrollbedingungen (n = 10, links) und unter Urapidilgabe (n = 9, rechts) am 130. Gestationstag, \*  $p < 0,05$  vgl. zu Baseline vor Isolation;  $*_a$   $p < 0,05$  vgl. zu Baseline vor Urapidil;  $*_b$   $p < 0,05$  vgl. zu Baseline unter Urapidil

## 6 Diskussion

### 6.1 Diskussion der Methodik

#### 6.1.1 Das „fetale Schaf“ als tierexperimentelles Modell

Das „chronisch-instrumentierte fetale Schaf“ ist seit vielen Jahren in der Wissenschaft als Tiermodell für die menschliche Fetalperiode fest etabliert. Studien verschiedenster Fragestellungen wurden seither mit dem genannten Tiermodell durchgeführt. So hatte Liggins instrumentierte Schafe zum Nachweis der fetalen Lungenreife bei der Gabe von synthetischen Glukokortikoiden verwendet (Liggins 1969). Auch Studien mit intrauterinen kardiovaskulären Fragestellungen griffen auf das „fetale Schaf“ zurück (Neuman et al. 1980, Kirkpatrick et al. 1976).

Im Gegensatz zur postnatalen Reifung der Stressachse bei Nagetieren reift die Stressachse des fetalen Schafes, wie auch beim Menschen, bereits im letzten Trimenon (Challis und Brooks 1989). Dies macht es zu einem idealen Modell für das Forschungsgebiet der fetalen Programmierung.

#### 6.1.2 Chirurgische Instrumentierung

Die operative Instrumentierung macht es möglich, dass stressrelevante Parameter, wie Blutdruck, Herzfrequenz und UBF, kontinuierlich über den gesamten Versuchsablauf sowohl von der Mutter als auch vom Feten aufgezeichnet werden können. Zusätzlich wird durch das Einbringen der Katheter die Gewinnung von Blutproben während der Versuche nicht nur erleichtert, sondern erspart den Tieren stressauslösende repetitive Venenpunktionen (Giannakouloupoulos et al. 1994). Ein weiterer Vorteil des verwendeten Tiermodells liegt darin, dass Schafe im Gegensatz zu anderen Säugetieren, wie z.B. Schweinen, vorwiegend Einlings- oder Zwillingschwangerschaften austragen. Dies macht eine derartige chirurgische Instrumentierung überhaupt erst möglich. Auch die Größe der Schafsfeten ermöglicht eine Instrumentierung und erlaubt somit das Aufzeichnen verschiedenster physiologischer Parameter (Back et al. 2006). Wegen ihrer Robustheit tolerieren die Muttertiere im Gegensatz zu Primaten die operativen Eingriffe gut.

In Studien wurde gezeigt, dass eine operative Instrumentierung am trächtigen Schaf nicht nur zu einer Verkürzung der mittleren Trächtigkeitsdauer führen kann, sondern auch die Muttertiere in ca. 35% der Fälle eine Frühgeburt erleiden (Bessette und Rurak 2010). Auf Grund dieser Studienlage haben wir den Gesundheitszustand der Tiere postoperativ engmaschig kontrolliert. Nach der chirurgischen Instrumentierung zeigten die Tiere weder anhand des klinischen Zustandes noch anhand der Blutgase Anzeichen eines verschlechterten Gesundheitszustandes. Weiterhin verstarben keine Tiere. Zudem hatten alle Schafe etwa zwei Stunden nach der Operation wieder angefangen zu fressen. Wegen des hohen Stresspotenzials wurde ebenso auf eine ausreichende postoperative Erholungsphase geachtet. Nichtsdestotrotz stellt die Operation als zusätzlicher Stressor einen systematischen Fehler dar. Da aber sowohl Tiere der frühen als auch Tiere der späten Kontrollgruppe der chirurgischen Instrumentierung unterzogen wurden, beeinflusst dieser Stressor das Ergebnis bezüglich der Gruppenunterschiede nicht.

### **6.1.3 Akute Isolationsversuche**

Um die aufgestellten Hypothesen zu überprüfen, wurde ein Stressmodell benötigt, welches nicht nur wiederholbar ist, sondern auch ein möglichst geringes Risiko der Adaptation mit sich bringt. Da das Schaf als Herdentier sehr sensitiv auf psychosoziale Stressoren reagiert, eignet sich die Isolation von der Herde sehr gut als Stressmodell (Parrott et al. 1994). Zudem wurde bereits untersucht, dass eine Isolation beim Schaf zu einer Aktivierung der HHN-Achse führt (Coppinger et al. 1991). Auch in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe etablierte sich der Isolationsstress als artgerechter und valider Stressor (Rakers et al. 2013). Dabei ist hinzuzufügen, dass es sich beim akuten Isolationsversuchen, tatsächlich um eine akute Stresssituation handelt, welche beim Menschen in etwa vergleichbar mit einer Prüfung oder einem Bewerbungsgespräch ist. Chronischer Stress, wie er in der Schwangerschaft häufig auftritt, wird damit nicht wiedergespiegelt.

Die akuten Isolationsversuche ohne Medikamentengabe wurden an zwei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt: einerseits zum frühestmöglichen Zeitpunkt einer chirurgischen Instrumentierung, andererseits zum Zeitpunkt des größten exponentiellen Wachstums. Damit war es uns möglich zu beurteilen, ob vergleichbarer Stress an verschiedenen Zeitpunkten auch unterschiedliche Effekte auf den Feten hat.

Neben dem akuten Isolationsstress, welchen alle Schafe einmalig durchliefen, wurden an einigen Schafen der Kontrollgruppen maximal zwei weitere Isolationsversuche unter sympathoadrener Blockade durchgeführt. Obwohl das Stressmodell nur ein geringes Risiko der Adaptation mit sich bringt, ist eine Gewöhnung an das Versuchslabor und den Versuchsablauf nicht vollkommen auszuschließen. Damit stellt die Wiederholung der Isolationsversuche an den gleichen Tieren eine Limitation im Sinne einer möglicherweise verminderten Stressausprägung dar. Jedoch zeigten die Muttertiere auch in den wiederholten Isolationsversuchen eine Stressantwort mit einem Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz, sodass die mögliche Adaptation an den Stressor Isolation eher gering ausgeprägt war.

#### **6.1.4 Ableitung der auszuwertenden Parameter**

Bei der Ableitung der physiologischen Parameter wurde streng auf die Reproduzierbarkeit und die Stabilität der Messung geachtet. Auch die Stabilität der Blutdruck-Transducer, welche ebenso im klinischen Alltag Verwendung finden, wurde durch regelmäßige Kontrollen gewährleistet.

Die Ableitung des UBF wurde über Flusssonden realisiert. Die Funktionalität und Stabilität der Sonden dieser Messmethode wurden in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt (Schwab et al. 2006). Vor jeder Implantation wurde eine Eichung der Sonden durchgeführt. Da aber der Gefäßdurchmesser der Arteria uterina zwischen den Individuen stark variiert und da die Messung des UBF direkt vom Gefäßdurchmesser abhängt, ergab sich in den Ergebnissen eine Gefäßdurchmesserbedingte interindividuelle Varianz der absoluten Messwerte. Die Fluss-Messung in einem Individuum war dennoch über den gesamten Versuch stabil. Um den daraus resultierenden Verzerrungseffekt zu umgehen, wurden die Werte des UBF normiert und stellen keine absoluten Messwerte dar. Dabei wurden die Baseline Mittelwerte jedes einzelnen Tieres, unabhängig von der zugeordneten Gruppe, aufsummiert und anschließend durch die Anzahl der beteiligten Tiere dividiert.

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

### 6.2.1 Akute mütterliche Stressantwort

#### 6.2.1.1 Stresshormone der Muttertiere während der Isolation

Die Plasma-Noradrenalin- und Kortisolspiegel unter Basalbedingungen unterschieden sich zwischen den Muttertieren der frühen und der späten Kontrollgruppe nicht. Beim Menschen hingegen wird ein Anstieg des Kortisol unter Basalbedingungen mit fortschreitender Schwangerschaft in der Literatur beschrieben (Phocas et al. 1990).

Der mütterliche Noradrenalin- und Kortisolanstieg zu Beginn der Isolationsphase beweist, dass die Muttertiere durch Isolation von den übrigen Herdentieren Stress erlitten hatten. Damit ist die Funktionalität des Stressors „Isolation“, wie bereits in unseren Vorversuchen (Rakers et al. 2013), erneut sichergestellt.

Die Dauer und das Ausmaß des mütterlichen Katecholamin- und Kortisolanstieges waren zwischen den Muttertieren der frühen und der späten Kontrollgruppe nicht unterschiedlich.

#### 6.2.1.2 Blutgase und metabolische Parameter der Muttertiere während der Isolation

Die Blutgasparameter sowie Glukose und Laktat unterschieden sich unter Basalbedingungen zwischen den Muttertieren der frühen und der späten Kontrollgruppe nicht.

Isolationsstress führte zu keinen wesentlichen Änderungen der Blutgasparameter bei den Muttertieren der frühen und späten Kontrollgruppe. Es fiel lediglich bei den Muttertieren der späten Kontrollgruppe ein transienter Abfall des  $p\text{CO}_2$  bei gleichzeitigem Anstieg des  $p\text{O}_2$  unmittelbar nach Isolationsbeginn auf. Dies ist am ehesten Ausdruck einer respiratorischen Alkalose auf Grund einer durch Stress bedingten Hyperventilation (Walker et al. 1995). Möglicherweise ist auf wegen einer schnellen metabolischen Kompensation ein signifikanter Anstieg des mütterlichen pH-Wertes ausgeblieben.

Sowohl in der frühen als auch in der späten Kontrollgruppe zeigte sich unmittelbar bzw. 15 Minuten nach Isolationsbeginn bei den Muttertieren ein Laktatanstieg. Dieser könnte die Folge einer durch Stress bedingten, peripheren Katecholamin-induzierten

Vasokonstriktion mit Umstellung auf anaerobe Energiegewinnung sein (Yates et al. 2012). Folglich kann die o.g. Hyperventilation bei den Muttertieren der späten Kontrollgruppe auch als respiratorische Kompensation bei beginnender Laktazidose gewertet werden (Svendsen 1979). Die fehlenden Änderungen im Säure-Basen-Haushalt erklären sich hier am ehesten durch eine rasche respiratorische Kompensation.

#### 6.2.1.3 Kardiovaskuläre Parameter der Muttertiere und uteriner Blutfluss während der Isolation

Unter Basalbedingungen war die mütterliche Herzfrequenz in der späten Kontrollgruppe höher als in der frühen Kontrollgruppe. Auch beim Menschen nimmt die mütterliche Herzfrequenz mit zunehmender Schwangerschaftsdauer zu (Clapp 1985, Metcalfe und Parer 1966).

Unter Isolationsstress war die Stressantwort mit einem Herzfrequenz- und Blutdruckanstieg bei den Muttertieren der frühen und späten Kontrollgruppe gleich. Sie ist typischer Ausdruck einer Sympathikusaktivierung, wobei sich der Blutdruckanstieg durch eine Katecholamin-bedingte Vasokonstriktion im peripheren Gefäßbett erklärt (Wheeler et al. 1980).

Der Verlauf des UBF spiegelt das Flussvolumen, welches in einer vorgegebenen Zeit durch das uterine Gefäßbett fließt, wider. Der Isolationsstress führte zu einem transienten Abfall des UBF unabhängig vom Gestationsalter. Dies steht in Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien am fetalen Schaf, in denen gezeigt wurde, dass physische Stressoren, wie z.B. laute Geräusche, zu einer Verminderung des UBF bei gleichzeitig erhöhter mütterlicher Noradrenalinausschüttung führen (Shnider et al. 1979). Auch in unserem Versuch kam es zu einer signifikant erhöhten mütterlichen Noradrenalinausschüttung, weshalb für den UBF-Abfall am ehesten eine Katecholamin-bedingte Vasokonstriktion der Arteriae uterinae ursächlich ist (Barton et al. 1974). Interessanterweise war der UBF-Abfall verglichen mit dem Blutdruckanstieg in beiden Kontrollgruppen deutlich prolongiert, sodass sich die Wirkung von Katecholaminen im Uterus und im peripheren Gefäßbett möglicherweise unterscheidet. Tatsächlich ist das Verhältnis der adrenergen Rezeptoren in uterinen und peripheren Gefäßen während der Schwangerschaft zugunsten der uterinen Gefäße verschoben. So wurde bei Schweinen eine im Laufe der Schwangerschaft



zunehmende Dichte der endothelialen uterinen  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren nachgewiesen (Arkinstall und Jones 1989, Martensson und Carter 1982). Die erhöhte Rezeptorendichte wird am ehesten durch Progesteron bewirkt (Ford 1995). Dadurch kann die erhöhte Sensitivität der  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren gegenüber Katecholaminen mit konsekutiver Vasokonstriktion im uterinen Gefäßbett im Vergleich zu peripheren Gefäßen erklärt werden (Magness und Rosenfeld 1986).

## 6.2.2 Akute fetale Stressantwort

### 6.2.2.1 Stresshormone der Feten während der Isolation

#### a. *Noradrenalin*

Die fetale endogene Noradrenalinproduktion repräsentiert ein funktionsfähiges Nebennierenmark sowie die Funktionalität der sympathischen Nervenfasern (Phillippe 1983).

Die höheren basalen Noradrenalin Spiegel im Blutplasma der Feten der späten Kontrollgruppe spiegeln die Reifung des Nebennierenmarks und der sympathischen Nervenbahnen im Vergleich zu den Feten der frühen Kontrollgruppe wider. In der Literatur wird das Vorhandensein von Noradrenalin in Granula der sich entwickelnden Nebenniere bereits ab dem 53. Gestationstag beschrieben (Boshier et al. 1989). Ab dem 130. Gestationstag sind synaptische Verbindungen zwischen Nebennierenzellen und sympathischen Nervenfasern ausgeprägt (Boshier et al. 1989). Die Reifung des sympathischen Nervensystems wurde beim fetalen Schaf auch anhand des Blutdruckanstieges um den 130. Gestationstag (0,87 Gestationsdauer) als Ausdruck einer zunehmenden sympathischen Kontrolle der Herzfrequenz bei normalgewichtigen Feten nachgewiesen (Frasch et al. 2007).

Der durch Isolationsstress aufgetretene Noradrenalinanstieg wurde in ähnlichem Ausmaß auch bei Schaffeten während ultraschallgestützter perkutaner Venenpunktionen als Ausdruck der Stressreaktion gesehen (Newnham et al. 1994). Der relative und absolute Anstieg von Noradrenalin unter Isolation war bei den Feten der späten Kontrollgruppe stärker ausgeprägt als in der frühen Kontrollgruppe, was den intrauterinen Reifungsprozess des Nebennierenmarks und der sympathischen Nervenbahnen erneut unterstreicht. Da Katecholamine die Plazenta nicht passieren können (Giannakouloupoulos et al. 1999) und da während der Isolation der fetale

Noradrenalinanstieg gegenüber dem mütterlichen Noradrenalinanstieg deutlich prolongiert war, ist eine durch den mütterlichen psychischen Stress ausgelöste, endogene fetale Noradrenalinproduktion sehr wahrscheinlich. Am ehesten wird der fetale Noradrenalinanstieg durch den Abfall des UBF (s.o.) getriggert. Ein Anstieg der fetalen Noradrenalin Spiegel zeigte sich auch in Versuchen, bei denen eine Verminderung des UBF durch Abklemmen der Arteria uterina erzielt wurde (Gu et al. 1985). Interessant ist allerdings, warum ein Abfall des UBF um maximal 21% in beiden Gruppen zu einem derart prolongierten fetalen Noradrenalinanstieg führt. Prinzipiell ist die Plazenta durchaus in der Lage, eine Verringerung des UBF um bis zu 60% für eine kurze Zeit zu tolerieren, ohne dass der umbilikale Blutfluss davon beeinträchtigt wird (Berman et al. 1976). Als möglicher Triggermechanismus des Noradrenalinanstieges wird in der Literatur eine Hypoxie diskutiert (Yates et al. 2012). Verschiedene Studien haben diesbezüglich unterschiedliche Effekte einer UBF-Reduktion um 20-30%, die in etwa unserem UBF-Abfall entspricht, auf den fetalen  $pO_2$  gezeigt. Während Skillman et al. einen Abfall im fetalen  $pO_2$  nachweisen konnten, sahen Gu and Jones keinen Effekt auf den fetalen  $pO_2$  (Gu und Jones 1986, Skillman et al. 1985). Da in unserem Experiment die Feten der frühen Kontrollgruppe ebenfalls keinen und die Feten der späten Kontrollgruppe nur einen moderaten Abfall des  $pO_2$  zeigten, scheint ein Sauerstoffmangel nicht alleinige Ursache des Noradrenalinanstieges zu sein. Ein weiterer möglicher Mechanismus könnte in der Veränderung der unter Normbedingungen sehr effektiven und raschen plazentaren Metabolisierung des fetalen Noradrenalins bestehen (Jones und Robinson 1975). Diese Metabolisierung erfolgt über den plazentaren Amino-Plasma-Membran-Transporter, welcher für die fetale Homöostase im Sinne möglichst geringer fetaler Katecholaminspiegel essentiell ist (Bzoskie et al. 1995). In der Tat kann die Expression dieses Transporters bei intrauterinem Stress oder plazentarer Dysfunktion vermindert sein und zu erhöhten fetalen Noradrenalin Spiegeln führen (Bzoskie et al. 1997). Der kurze Kortisolanstieg (s.u.) scheint in keinem Zusammenhang mit dem prolongierten Noradrenalinanstieg zu stehen, da die Gabe von Glukokortikoiden beim trächtigen Schaf eher zu einem erniedrigten fetalen Katecholaminspiegel führte (Derks et al. 1997).

### *b. Kortisol*

Die im Feten gemessene Konzentration an Kortisol setzt sich zusammen aus der endogenen fetalen Kortisolproduktion der Nebennierenrinde und etwa 10% des mütterlichen Kortisolspiegels, die nicht durch die 11 $\beta$ -HSD inaktiviert werden (siehe 2.4.1.1) (Xiong und Zhang 2013).

Unter Ausgangsbedingungen gab es lediglich einen tendenziellen Unterschied zwischen den Plasma-Kortisolspiegeln der Feten der frühen und der späten Kontrollgruppe. Auch unter Isolationsstress war die Kortisolausschüttung bei den Feten der späten Kontrollgruppe in Tendenz höher als in der frühen Kontrollgruppe. Dies ist am ehesten Ausdruck der intrauterinen Reifung der fetalen HHN-Achse (Challis und Brooks 1989). Allerdings ist es nicht unwahrscheinlich, dass das in der fetalen Zirkulation gemessene Kortisol mütterlichen Ursprungs ist. So beträgt der maximale fetale Kortisolanstieg in Relation zum mütterlichen Kortisolanstieg nur 13% in der frühen und 15% in der späten Kontrollgruppe. Dieser Anstieg entspricht in etwa dem Anteil an mütterlichem Kortisol (~10%), welcher die Plazenta passiert. Außerdem ist die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD bei Stress herabgesetzt ist, was dazu führt, dass mehr Kortisol über die Plazenta in den fetalen Kreislauf gelangt als in Ruhephasen (Mairesse et al. 2007). Die Vermutung, dass der fetale Kortisolanstieg mütterlichen Ursprungs ist, wird zusätzlich dadurch unterstrichen, dass das Ausmaß der relativen mütterlichen und fetalen Kortisolausschüttung über den zeitlichen Verlauf sehr ähnlich ist. Auch die Tatsache, dass die Nebennierenrindenaktivität beim fetalen Schaf am 110. Gestationstag (0,73 Gestationsdauer) stark verringert ist (siehe 2.3.1.2), weist insbesondere in der frühen Kontrollgruppe eher darauf hin, dass das fetale Kortisol von der Mutter stammt (Wintour et al. 1975).

#### 6.2.2.2 Blutgase und metabolische Parameter der Feten während der Isolation

Der pH-Wert der Feten der frühen und späten Kontrollgruppe fiel während des Isolationsversuches verzögert in Tendenz bzw. signifikant ab. Die Azidose ist am ehesten Ausdruck einer Laktatämie, welche mit den erhöhten fetalen Laktatwerten während der Isolation in der frühen und späten Kontrollgruppe übereinstimmt. Der vermehrte Anfall von Laktat weist auf eine Umstellung in Richtung einer anaeroben Stoffwechsellage im Feten hin. Ursächlich kommt ein durch die UBF-Reduktion bedingter Abfall des pO<sub>2</sub> sowie der sO<sub>2</sub>, wie es bei den Feten der späten

Kontrollgruppe nachgewiesen wurde, mit konsekutiver Umstellung auf einen anaeroben Stoffwechsel in Betracht. Ein ähnlicher Abfall des fetalen  $pO_2$  wurde bei einer Reduktion des UBF um 20%, welcher in der Größenordnung unseres UBF-Abfall liegt, durch Abklemmen der Arteriae iliacae internae bei trächtigen Schafen nach dem 115. Gestationstag (0,77 Gestationsdauer) beobachtet (Skillman et al. 1985). Eine respiratorische Ursache der Azidose ist eher unwahrscheinlich, da es zu keiner wesentlichen Änderung des  $pCO_2$  während des Isolationsstresses in der frühen und späten Kontrollgruppe kam.

Interessanterweise zeigten die Feten der späten Kontrollgruppe bei ähnlicher Restriktion des UBF im Vergleich zu den Feten der frühen Kontrollgruppe eine beginnende Sauerstoffminderversorgung. Demnach scheint der Sauerstoffbedarf bei den Feten der späten Kontrollgruppe höher zu sein. Der (relative) Mangel an Sauerstoff wird durch den Laktatanstieg, als Ausdruck einer Umstellung in Richtung einer anaeroben Stoffwechsellage, unterstrichen. Zudem wächst der Fetus vor allem im letzten Trimenon exponentiell, womit sich sowohl der Nährstoff- als auch der Sauerstoffbedarf ebenso exponentiell erhöhen (Ford 1995). Dem gegenüber steht die Tatsache, dass das Angebot an plazentarem Sauerstoff den tatsächlichen Bedarf des Feten unter Basalbedingungen um etwa das Doppelte deckt, wodurch eigentlich eine ausreichende Perfusionsreserve entsteht (Meschia 1985, Lang et al. 2003). Der biologische Sinn liegt in der Gewährleistung einer ausreichenden Sauerstoffversorgung in Akutsituationen mit drohender Minderperfusion. Offensichtlich scheint diese Reserve bei den Feten der späten Kontrollgruppe nicht mehr auszureichen.

Die Azidose der Feten kann außerdem direkte Folge des fetalen Noradrenalinanstieges sein (Gu et al. 1985). Dieser führt über eine periphere Vasokonstriktion zu einer Umstellung auf anaeroben Stoffwechsel mit konsekutiver Laktatämie (Yates et al. 2012, Gu et al. 1985). Ähnliche Ergebnisse wurden bei direkter Noradrenalininfusion in den Feten erzielt (Bocking et al. 1995). Dabei induzieren Katecholamine eine  $\beta$ -Adrenorezeptor-vermittelte Umwandlung von Glukose in Laktat (Gournay et al. 1999, Jones und Ritchie 1978, Kusaka und Ui 1977).

Es ist weiterhin denkbar, dass das fetale Laktat zumindest teilweise mütterlichen Ursprungs ist. Allerdings war der fetale Laktatanstieg in der frühen und späten Kontrollgruppe im Vergleich zum mütterlichen Laktatanstieg während des Isolationsversuches zeitversetzt, sodass eine fetale Laktatproduktion wahrscheinlicher ist.

#### 6.2.2.3 Kardiovaskuläre Parameter der Feten während der Isolation

Die niedrigere Herzfrequenz bei den Feten der späten Kontrollgruppe im Vergleich zu den Feten der frühen Kontrollgruppe unter Basalbedingungen ist durch eine Reifung der vagalen Aktivität der Feten zwischen dem 114. und 130. Gestationstag (0,76 bis 0,87 Gestationsdauer) zu erklären (Walker et al. 1978, Frasch et al. 2007). So ist ein Abfall der Herzfrequenz mit zunehmendem Gestationsalter typisch (Frasch et al. 2007).

Der Blutdruck der Feten der frühen und späten Kontrollgruppe unterschied sich unter Basalbedingungen nicht. In der Literatur wird allerdings ein Anstieg des fetalen Blutdruckes mit steigendem Gestationsalter beim fetalen Schaf beschrieben (Muller et al. 2002). Frasch et al. konnten bei normalgewichtigen Feten einen Blutdruckanstieg zum 130. Gestationstag (0,87 Gestationsdauer) als Ausdruck einer Reifung der sympathischen Aktivität nachweisen (Frasch et al. 2007). Möglicherweise ist die Reifung des Sympathikus bei den Feten der späten Kontrollgruppe (Alter: 0,86 Gestationsdauer) noch nicht ausreichend vorangeschritten, um eine signifikante Blutdruckerhöhung zu bewirken.

Unter Isolationsstress kam es zu keiner Änderung der fetalen Herzfrequenz. Zwar zeigten alle Feten erhöhte Noradrenalinspiegel und damit eine erhöhte sympathische Aktivität, allerdings scheint der Anteil der zirkulierenden Katecholamine während der Fetalperiode nur einen geringen Einfluss auf die Herzaktion zu nehmen (Booth et al. 2011). Auch bei Schaffeten deren Nebennierenmark mittels Injektion von Formalin ausgeschaltet wurde, blieb die Regulation der Herzfrequenz unverändert (Jones et al. 1988). Zudem ist der Einfluss der direkten sympathischen Innervation auf die Herzfrequenz wegen des zunehmenden Einflusses der parasympathischen Aktivität im letzten Trimenon der Schwangerschaft eher gering (Walker et al. 1978).

Unter Isolationsstress stieg der fetale Blutdruck in der frühen Kontrollgruppe an. Dieser Anstieg kann einerseits Katecholamin- und andererseits Glukokortikoid-vermittelt sein. Beide Stresshormone bewirken sowohl ein erhöhtes Herzminutenvolumen als auch einen erhöhten peripheren Gefäßwiderstand (Bocking et al. 1995, Derks et al. 1997). Da der Blutdruckanstieg prolongiert war, ist dem Kortisol möglicherweise eine stärkere Rolle zuzuschreiben, da dieses im Gegensatz zu den nur transient wirkenden Katecholaminen eine prolongierte Wirkung hat. Allerdings wurde der zur detaillierten Differenzierung nötige nervale Sympathikotonus während des Isolationsversuches nicht gemessen.

Die fehlende Blutdruckreaktion der Feten der späten Kontrollgruppe bleibt trotz des fetalen Noradrenalin- und Kortisolanstieges unklar. In Übereinstimmung mit fehlendem, aber zu erwartenden reifungsbedingtem Blutdruckanstieg im Vergleich zur frühen Kontrollgruppe werden auch in der Literatur unterschiedliche Effekte eines Noradrenalinanstieges auf den fetalen Blutdruck diskutiert. Während Bocking et al. nach einer Noradrenalininfusion einen fetalen Blutdruckanstieg nachweisen konnten (Bocking et al. 1995), blieb der fetale Blutdruck bei Jones und Robinson nach induzierter Hypoxie mit gleichzeitigem Katecholaminanstieg unverändert (Jones und Robinson 1975). Untersuchungen bezüglich fetaler kardiovaskulärer Parameter unter Stress existieren nicht.

### **6.2.3 Effekte einer kombinierten $\alpha_1$ - und $\beta_{1,2}$ -Adrenorezeptorblockade mittels Labetalol auf die mütterliche Stressantwort**

#### **6.2.3.1 Blutgase und metabolische Parameter der Muttertiere während der Labetalolgabe und der nachfolgenden Isolation**

Die infundierte Labetaloldosis wurde beim fetalen Schaf so gewählt, dass sie in der Wirkung äquivalent zur Dosis ist, welche beim Menschen eine antihypertensive Wirkung erzielt. Unter der Labetalolgabe (vor Isolation) kam es zu keiner Änderung der Blutgase der Muttertiere. Konstante Blutgase wurden auch nach einer Bolusgabe von Labetalol unter laufender Norepinephrininfusion bei trächtigen Schafen gesehen (Eisenach et al. 1991). Allerdings stiegen unter Labetalolgabe (vor Isolation) sowohl die mütterlichen Blutglukose- als auch die mütterlichen Laktatwerte an. Dies ist am ehesten eine direkte Folge der Labetalolgabe (Yeleswaram et al. 1992). Bisher sind die zugehörigen Mechanismen diesbezüglich nur unzureichend verstanden. Labetalol

wird dabei eine partielle  $\beta_2$ -agonistische Wirkung zugeschrieben, welche möglicherweise in Zusammenhang mit einem Glukose- und Laktatanstieg steht (Yeleswaram et al. 1992).

Während der Isolation unter Labetalol blieben die Blutgase konstant. Hierbei trat v.a. im Vergleich zur Isolation unter Kontrollbedingungen keine Hyperventilation unmittelbar nach Isolationsbeginn auf. Eine durch Stress bedingte Hyperventilation wurde möglicherweise durch Labetalol verhindert. In der Literatur gibt es bezüglich psychosozialen Stresses unter Labetalolgabe keine Daten. Der mütterliche Laktatspiegel im Blutplasma stieg hingegen unmittelbar nach Isolationsbeginn weiter an. Dieser Laktatanstieg könnte durch die Bindung von Katecholaminen an die  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren im peripheren Gefäßbett mit Vasokonstriktion und konsekutivem anaeroben Stoffwechsel vermittelt werden (Yates et al. 2012). Damit scheinen trotz Rezeptorenblockade mittels Labetalol einige Rezeptoren frei zu sein, an denen zirkulierende Katecholamine binden können, welche eine vasokonstringierende Wirkung ausüben (Wheeler et al. 1980). Weiterhin kann der Laktatanstieg Folge einer direkten Labetalolwirkung über einen partiellen  $\beta_2$ -Agonismus sein (Yeleswaram et al. 1992). Da die Laktatkonzentration während der Isolation unter Labetalol signifikant höher war als unter Kontrollbedingungen, scheint die direkte Labetalolwirkung als Ursache der Laktatämie wahrscheinlicher (Yeleswaram et al. 1992). Auch der mütterliche Blutglukosespiegel stieg nach Isolationsbeginn weiter an. Dies ist im Rahmen der Stressantwort durch die erhöhte Kortisolausschüttung zu erklären (Niezgoda et al. 1993). Zudem hemmen die ausgeschütteten Katecholamine eine Glukose-induzierte Insulinfreisetzung, was eine prolongierte Erhöhung der Glukosekonzentration zur Folge hat (Yates et al. 2012). Letztlich kann auch der Glukoseanstieg, analog zum Laktatanstieg, Folge einer partiellen  $\beta_2$ -Agonisten-Wirkung des Labetalols sein (Yeleswaram et al. 1992).

#### 6.2.3.2 Kardiovaskuläre Parameter der Muttertiere und uteriner Blutfluss während der Labetalolgabe und der nachfolgenden Isolation

Unter Labetalolgabe (vor Isolation) kam es zu einem signifikanten Abfall des mütterlichen Blutdruckes. Dieser ist auf eine periphere Vasodilatation durch Blockade der  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren zurück zu führen (van Zwieten 1993). Weiterhin zeigte sich unter Labetalolgabe (vor Isolation) ein tendenzieller Abfall der mütterlichen

Herzfrequenz. Wegen der kombinierten Blockade der  $\alpha_1$ - und  $\beta_{1,2}$ -Adrenorezeptoren blieb eine durch Vasodilatation getriggerte Reflextachykardie aus (van Zwieten 1993).

Unter kontinuierlicher Labetalolgabe sank der UBF um 16%. Dies ist durch den signifikanten Abfall des mütterlichen Blutdruckes zu erklären (Nuwayhid et al. 1975, Feldman et al. 1988). Labetalol hat keine direkten Effekte auf die uterinen Gefäße, da diese während der späten Schwangerschaft bereits maximal dilatiert sind (Mohan et al. 1990). Demnach sinkt mit gleichbleibendem Gefäßdurchmesser aber sinkender Flussgeschwindigkeit das Flussvolumen pro Zeiteinheit, welches die Arteriae uterinae passiert (Erkinaro et al. 2009).

Mit Isolationsbeginn stieg der mütterliche Blutdruck ähnlich zur Isolation unter Kontrollbedingungen für kurze Zeit an. Dies unterstreicht die o.g. Aussage, dass nicht alle Adrenorezeptoren durch Labetalol blockiert wurden. Zudem war ein kurzer Anstieg der mütterlichen Herzfrequenz als Ausdruck der Sympathikusaktivierung auffällig. Die Tatsache, dass dieser signifikant kürzer ausgeprägt war als bei Isolation unter Kontrollbedingungen, spiegelt die (teilweise) Rezeptorenblockade wider.

Der UBF stieg mit Beginn der Isolation tendenziell an. Dies steht ganz im Gegensatz zum Abfall des UBF bei Isolation unter Kontrollbedingungen. Ursache dessen ist neben dem erhöhte Herzminutenvolumen, auch die durch die kombinierte  $\alpha_1$ - und  $\beta_{1,2}$ -Adrenorezeptorblockade verhinderte durch Stress bedingte Vasokonstriktion der uterinen Gefäße (MacCarthy und Bloomfield 1983). Dies bestätigt unsere Hypothese, dass eine Reduktion des UBF indirekt über Katecholamine vermittelt wird:

Der Isolationsstress führte zu einer Ausschüttung von Noradrenalin, welches an  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren der Arteriae uterinae band und eine Vasokonstriktion bewirkte (Segal und Wang 2008). Auch nach direkter Katecholamininfusion in die Mutter wurde ein Abfall des UBF beobachtet (Gu und Jones 1986). Blockiert man die Adrenorezeptoren, können die freigesetzten Katecholamine zu einem großen Teil nicht wirken, wodurch ein Abfall des UBF ausbleibt.

Die Effekte der Labetalolgabe auf die fetale Stressantwort sind an dieser Stelle nicht aufgeführt, da Labetalol plazentagängig ist und somit eine Differenzierung der Veränderungen durch die Stressantwort und der Veränderungen durch die  $\alpha_1$ - und  $\beta_{1,2}$ -adrenerge Blockade nicht möglich ist (Yeleswaram et al. 1993, Yeleswaram et al. 1992).



## **6.2.4 Effekte einer $\alpha_1$ -Adrenorezeptorblockade mittels Urapidil auf die mütterliche Stressantwort**

### **6.2.4.1 Blutgase und metabolische Parameter der Muttertiere während der Urapidilgabe und der nachfolgenden Isolation**

Unter der Urapidilgabe (vor Isolation) änderten sich weder die Blutgase noch die Blutglukose- und Laktatspiegel der Muttertiere.

Auch mit Beginn der Isolation änderten sich die Blutgase, ähnlich dem Isolationsversuch unter Labetalol, nicht. Allerdings stieg kurz nach Isolationsbeginn der mütterliche Laktatspiegel für kurze Zeit signifikant an. Dies könnte, analog zum Labetalolversuch, durch eine  $\alpha_1$ -vermittelte Vasokonstriktion mit konsekutiver Umstellung auf einen anaeroben Stoffwechsel vermittelt sein (Yates et al. 2012). Ob eine Azidose auch direkte Folge der Urapidilwirkung sein kann, ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

### **6.2.4.2 Kardiovaskuläre Parameter der Muttertiere und uteriner Blutfluss während der Urapidilgabe und der nachfolgenden Isolation**

Unter der Gabe von Urapidil (vor Isolation) zeigte sich ein signifikanter Abfall des mütterlichen Blutdruckes. Analog zu den Effekten unter Labetalolgabe bewirkte die  $\alpha_1$ -Blockade über eine periphere Vasodilatation einen Abfall des mütterlichen Blutdruckes (van Zwieten 1993). Dies steht jedoch im Widerspruch zur Studie von Oakes et al., die zeigte, dass eine  $\alpha$ -Adrenorezeptorblockade keine Wirkung auf den Gefäßtonus unter Basalbedingungen hat (Oakes et al. 1980). Die mütterliche Herzfrequenz hingegen änderte sich unter Urapidilgabe (vor Isolation) nicht. Auch hier blieb die zu erwartende Reflextachykardie aus. Anders als bei der kombinierten  $\alpha_1$ - und  $\beta_{1,2}$ -Adrenorezeptorblockade durch Labetalol ist die Ursache hier eher in der zentral dämpfenden Wirkung von Urapidil über 5-HT-1A-Rezeptoren begründet (van Zwieten 1996).

Zudem fiel der UBF unter Urapidilgabe (vor Isolation), analog zum Isolationsversuch unter Labetalol, um 23% ab. Die Ursache hierfür ist wiederum der verminderte Blutdruck (Nuwayhid et al. 1975). Demnach sank, analog zur Isolation unter Labetalol, mit gleichbleibendem Gefäßdurchmesser aber sinkender Flussgeschwindigkeit das

Flussvolumen pro Zeiteinheit, welches die Arteriae uterinae passiert (Erkinaro et al. 2009).

Mit Beginn der Isolation stieg sowohl der mütterliche Blutdruck als auch die mütterliche Herzfrequenz als Zeichen der sympathischen Reaktion für kurze Zeit an. Während im Vergleich zur Isolation unter Kontrollbedingungen der Blutdruckanstieg annähernd gleich war, war der Herzfrequenzanstieg kürzer. Dies kann auf die zentral dämpfende Wirkung von Urapidil zurückgeführt werden (van Zwieten 1996).

Der UBF blieb mit Isolationsbeginn konstant. Auch Resnik et al. sahen unter Gabe eines  $\alpha$ -Adrenorezeptor-Antagonisten keinen Nikotin-induzierten Abfall des UBF (Resnik et al. 1979). Das Ausbleiben des UBF-Abfalls unter  $\alpha_1$ -Adrenorezeptorblockade erläutert den Mechanismus der indirekten Katecholaminwirkung noch näher:

Die Katecholamine binden an  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren und bewirken über eine Vasokonstriktion der Arteriae uterinae einen Abfall des UBF

Blockiert man folglich den  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor, können die zirkulierenden Katecholamine nicht binden und ein Abfall des UBF bleibt aus.

Die Effekte der Urapidilgabe auf die fetale Stressantwort sind, analog zur Labetalolgabe, nicht dargestellt, da auch Urapidil plazentagängig ist und somit eine Differenzierung der Veränderungen durch die Stressantwort und der Veränderungen durch die  $\alpha_1$ -adrenerge Blockade nicht möglich ist.

## 7 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass mütterlicher Stress nicht nur durch Kortisol, sondern auch über eine Katecholamin-vermittelte Reduktion des UBF auf den Feten übertragen wird. Die verminderte Blutversorgung führt im Feten zu einer Verschiebung der Stoffwechsellage in Richtung einer anaeroben Stoffwechselsituation. Eine indirekte Übertragung des Stresses über Katecholamine steht dem bisherigen Dogma, dass alleinig Kortisol für die Übertragung von mütterlichem Stress auf den Feten verantwortlich ist, entgegen. Damit können auch die bedeutenden Effekte von mütterlichem Stress in der frühen Schwangerschaft erklärt werden, wenn noch keine fetalen Glukokortikoidrezeptoren exprimiert werden.

Der relative Beitrag von Kortisol und Katecholaminen an der Stressübertragung sollte zukünftig in weiteren Studien geklärt werden durch z.B. die Untersuchung von Stress unter fetaler Gabe eines Glukokortikoidrezeptor-Antagonisten in der späten Schwangerschaft. Des Weiteren gilt es auch Isolationsversuche während der ersten Hälfte der Schwangerschaft durchzuführen, um zu überprüfen, ob die uterine Vasokonstriktion auch dann auftritt, wenn noch keine Glukokortikoidrezeptoren exprimiert sind und der Einfluss von Stress auf die neuropsychologische Entwicklung am größten ist. Diese Versuche können dann allerdings nur ohne eine chronische Instrumentierung der Feten erfolgen. Außerdem gilt es zu untersuchen, inwieweit die Reduktion des UBF die Programmierung von Krankheiten im späteren Leben beeinflusst, insbesondere inwieweit sich eine fetale Minderversorgung auf die Hirnentwicklung auswirkt. Hier sollte besonderes Augenmerk auf IGF als Mittler zwischen fetaler Minderversorgung und gestörter Hirnentwicklung gelegt werden.

In einem weiteren Schritt sollten dann auch die Effekte von chronischem Stress auf den Feten untersucht werden. Stress tritt meist chronisch auf, sodass sich die Frage stellt, ob dieser möglicherweise zu einer Sensitivierung der fetalen Stressachse mit erhöhter Katecholamin- und Kortisolausschüttung unter Stressbedingungen oder im Gegenteil eher zu einer Adaptation mit einer „Stressresistenz“ des Feten auf Kosten eines erhöhten Stresslevels unter Normalbedingungen führt. Wenn die Kortisol-unabhängige Stressübertragung von der Mutter auf den Feten besser verstanden ist, könnten Möglichkeiten der Prävention und der Intervention entwickelt werden.

Die Aufklärungsmethode ist dabei jedoch vorsichtig auszuwählen. Möglicherweise führt eine zu progressive Aufklärung, d.h. allein das Wissen um die Effekte des Stressses, während der Schwangerschaft bereits zu Sorgen um das fetale Wohlergehen und somit zu psychischem Stress der Mutter.

Abschließend ist zu erwähnen, dass sowohl physischer als auch psychischer Stress in normalen Maße – auch während der Schwangerschaft – Bestandteil unseres Lebens sind. Ein vollkommen stressfreies Leben ist zum einen unmöglich und zum anderen auch nicht wünschenswert, dient doch positiver Stress erst dazu uns als Menschen und als Individuen weiterzuentwickeln. Besondere Vorsicht sollten Schwangere jedoch bei übermäßigem Stress walten lassen. Denn auch beim Stress gilt der wohl wichtigste Satz des Paracelsus: „Dosis facit venenum“.

## 8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abe H, Hidaka N, Kawagoe C, Odagiri K, Watanabe Y, Ikeda T, Ishizuka Y, Hashiguchi H, Takeda R, Nishimori T, Ishida Y. 2007. Prenatal psychological stress causes higher emotionality, depression-like behavior, and elevated activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neurosci Res*, 59 (2):145-151.
- Ackland JF, Ratter SJ, Bourne GL, Rees LH. 1986. Corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity and bioactivity of human fetal and adult hypothalami. *J Endocrinol*, 108 (2):171-180.
- Aghajafari F, Murphy K, Matthews S, Ohlsson A, Amankwah K, Hannah M. 2002. Repeated doses of antenatal corticosteroids in animals: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol*, 186 (4):843-849.
- Alexander N, Rosenlocher F, Stalder T, Linke J, Distler W, Morgner J, Kirschbaum C. 2012. Impact of antenatal synthetic glucocorticoid exposure on endocrine stress reactivity in term-born children. *J Clin Endocrinol Metab*, 97 (10):3538-3544.
- Alonso SJ, Damas C, Navarro E. 2000. Behavioral despair in mice after prenatal stress. *J Physiol Biochem*, 56 (2):77-82.
- Anegroaie P, Frasch MG, Rupprecht S, T M, H S, Witte OW, Schwab M. 2015 (in press). Development of somatosensory evoked potentials in fetal sheep and effects of Betamethasone. *Experimental Physiology*
- Antonow-Schlorke I, Muller T, Brodhun M, Wicher C, Schubert H, Nathanielsz PW, Witte OW, Schwab M. 2007. Betamethasone-related acute alterations of microtubule-associated proteins in the fetal sheep brain are reversible and independent of age during the last one-third of gestation. *Am J Obstet Gynecol*, 196 (6):553 e551-556.
- Antonow-Schlorke I, Helgert A, Gey C, Coksaygan T, Schubert H, Nathanielsz PW, Witte OW, Schwab M. 2009. Adverse effects of antenatal glucocorticoids on cerebral myelination in sheep. *Obstet Gynecol*, 113 (1):142-151.
- Arkininstall SJ, Jones CT. 1989. Myometrial alpha 1-adrenoceptors in pregnant guinea pig: their distribution and increased number. *Am J Physiol*, 256 (2 Pt 1):E215-220.
- Artal R. 1980. Fetal adrenal medulla. *Clin Obstet Gynecol*, 23 (3):825-836.
- Back SA, Riddle A, Hohimer AR. 2006. Role of instrumented fetal sheep preparations in defining the pathogenesis of human periventricular white-matter injury. *J Child Neurol*, 21 (7):582-589.
- Baker BL, Jaffe RB. 1975. The genesis of cell types in the adenohypophysis of the human fetus as observed with immunocytochemistry. *Am J Anat*, 143 (2):137-161.
- Ballard PL, Ning Y, Polk D, Ikegami M, Jobe AH. 1997. Glucocorticoid regulation of surfactant components in immature lambs. *Am J Physiol*, 273 (5 Pt 1):L1048-1057.
- Barbazanges A, Piazza PV, Le Moal M, Maccari S. 1996. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J Neurosci*, 16 (12):3943-3949.
- Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. 1989. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*, 2 (8663):577-580.
- Barton MD, Killam AP, Meschia G. 1974. Response of ovine uterine blood flow to epinephrine and norepinephrine. *Proc Soc Exp Biol Med*, 145 (3):996-1003.
- Basta-Kaim A, Szczesny E, Glombik K, Stachowicz K, Slusarczyk J, Nalepa I, Zelek-Molik A, Rafa-Zablocka K, Budziszewska B, Kubera M, Leskiewicz M, Lason W. 2014. Prenatal stress affects insulin-like growth factor-1 (IGF-1) level and IGF-1 receptor phosphorylation in the brain of adult rats. *Eur Neuropsychopharmacol*, 24 (9):1546-1556.
- Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR. 1993. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet*, 341 (8841):339-341.
- Bergmeier C, Schulze M, Rupprecht S, Witte OW, Schwab M. 2013. Differences in Vulnerable Periods for Programming of Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis (HPAA) Activity, Neuropsychiatric and Cerebrovascular Disorders in Rats. *Reproductive Sciences*, 20 (S3):274A-274A.

- Berman W, Jr., Goodlin RC, Heymann MA, Rudolph AM. 1976. Relationships between pressure and flow in the umbilical and uterine circulations of the sheep. *Circ Res*, 38 (4):262-266.
- Berry LM, Polk DH, Ikegami M, Jobe AH, Padbury JF, Ervin MG. 1997. Preterm newborn lamb renal and cardiovascular responses after fetal or maternal antenatal betamethasone. *Am J Physiol*, 272 (6 Pt 2):R1972-1979.
- Bessette NW, Rurak DW. 2010. Chronic fetal and maternal instrumentation in pregnant sheep: effect on gestation length and birthweight. *Reprod Fertil Dev*, 22 (2):459-467.
- BmFSFJ. 2011. Bundesministerium für Familie, Senioren, Frauen und Jugend.
- Bocking AD, White SE, Kent S, Fraher L, Han VK, Rundle H, Hooper SB. 1995. Effect of prolonged catecholamine infusion on heart rate, blood pressure, breathing, and growth in fetal sheep. *Can J Physiol Pharmacol*, 73 (12):1750-1758.
- Bolt RJ, Weissenbruch vMM, Lafeber HN, Delemarre-van de Waal HA. 2002. Development of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in the Fetus and Preterm Infant.
- Booth LC, Bennet L, Guild SJ, Barrett CJ, May CN, Gunn AJ, Malpas SC. 2011. Maturation-related changes in the pattern of renal sympathetic nerve activity from fetal life to adulthood. *Exp Physiol*, 96 (2):85-93.
- Boshier DP, Gavin CB, Holloway H. 1989. Morphometric analyses of adrenal gland growth in fetal and neonatal sheep. II. The adrenal medulla, with some observations on its ultrastructure. *J Anat*, 167:15-30.
- Brieu V, Tonon MC, Lutz-Bucher B, Durand P. 1989. Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity, arginine vasopressin-like immunoreactivity and ACTH-releasing bioactivity in hypothalamic tissue from fetal and neonatal sheep. *Neuroendocrinology*, 49 (2):164-168.
- Brodhun M, Coksaygen T, Antonow-Schlorke I, Müller T, Schubert H, Patt S, Nathanielsz PW, M S. 2003. Association of programmed cell death and glucocorticoid receptors during brain development in fetal sheep. *J Soc Gynecol Invest*.
- Brooks AN, Challis JR. 1988. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in birth. *Can J Physiol Pharmacol*, 66 (8):1106-1112.
- Brooks AN, Challis JR, Norman LJ. 1987. Pituitary and adrenal responses to pulsatile ovine corticotropin-releasing factor administered to fetal sheep. *Endocrinology*, 120 (6):2383-2388.
- Bzoskie L, Blount L, Kashiwai K, Humme J, Padbury JF. 1997. The contribution of transporter-dependent uptake to fetal catecholamine clearance. *Biol Neonate*, 71 (2):102-110.
- Bzoskie L, Blount L, Kashiwai K, Tseng YT, Hay WW, Jr., Padbury JF. 1995. Placental norepinephrine clearance: in vivo measurement and physiological role. *Am J Physiol*, 269 (1 Pt 1):E145-149.
- Campbell EA, Linton EA, Wolfe CD, Scraggs PR, Jones MT, Lowry PJ. 1987. Plasma corticotropin-releasing hormone concentrations during pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab*, 64 (5):1054-1059.
- Challis JR, Brooks AN. 1989. Maturation and activation of hypothalamic-pituitary adrenal function in fetal sheep. *Endocr Rev*, 10 (2):182-204.
- Challis JR, Dilley SR, Robinson JS, Thorburn GD. 1976. Prostaglandins in the circulation of the fetal lamb. *Prostaglandins*, 11 (6):1041-1052.
- Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ. 2000. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev*, 21 (5):514-550.
- Clapp JF, 3rd. 1985. Maternal heart rate in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 152 (6 Pt 1):659-660.
- Class QA, Lichtenstein P, Langstrom N, D'Onofrio BM. 2011. Timing of prenatal maternal exposure to severe life events and adverse pregnancy outcomes: a population study of 2.6 million pregnancies. *Psychosom Med*, 73 (3):234-241.
- Comline RS, Silver M. 1961. The release of adrenaline and noradrenaline from the adrenal glands of the foetal sheep. *J Physiol*, 156:424-444.
- Coppinger TR, Minton JE, Reddy PG, Blecha F. 1991. Repeated restraint and isolation stress in lambs increases pituitary-adrenal secretions and reduces cell-mediated immunity. *J Anim Sci*, 69 (7):2808-2814.

- Coupland RE. 1953. On the morphology and adrenaline-nor-adrenaline content of chromaffin tissue. *J Endocrinol*, 9 (2):194-203.
- Coupland RE. 1965. The natural history of chromaffin cell. Longmans
- Currie IS, Brooks AN. 1992. Corticotrophin-releasing factors in the hypothalamus of the developing fetal sheep. *J Dev Physiol*, 17 (5):241-246.
- Dalziel SR, Walker NK, Parag V, Mantell C, Rea HH, Rodgers A, Harding JE. 2005. Cardiovascular risk factors after antenatal exposure to betamethasone: 30-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet*, 365 (9474):1856-1862.
- Davis EP, Waffarn F, Sandman CA. 2011a. Prenatal treatment with glucocorticoids sensitizes the hpa axis response to stress among full-term infants. *Dev Psychobiol*, 53 (2):175-183.
- Davis EP, Glynn LM, Waffarn F, Sandman CA. 2011b. Prenatal maternal stress programs infant stress regulation. *J Child Psychol Psychiatry*, 52 (2):119-129.
- De Blasio MJ, Dodic M, Jefferies AJ, Moritz KM, Wintour EM, Owens JA. 2007. Maternal exposure to dexamethasone or cortisol in early pregnancy differentially alters insulin secretion and glucose homeostasis in adult male sheep offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293 (1):E75-82.
- de Vries A, Holmes MC, Heijnis A, Seier JV, Heerden J, Louw J, Wolfe-Coote S, Meaney MJ, Levitt NS, Seckl JR. 2007. Prenatal dexamethasone exposure induces changes in nonhuman primate offspring cardiometabolic and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *J Clin Invest*, 117 (4):1058-1067.
- Derks JB, Giussani DA, Jenkins SL, Wentworth RA, Visser GH, Padbury JF, Nathanielsz PW. 1997. A comparative study of cardiovascular, endocrine and behavioural effects of betamethasone and dexamethasone administration to fetal sheep. *J Physiol*, 499 ( Pt 1):217-226.
- Diego MA, Jones NA, Field T, Hernandez-Reif M, Schanberg S, Kuhn C, Gonzalez-Garcia A. 2006. Maternal psychological distress, prenatal cortisol, and fetal weight. *Psychosom Med*, 68 (5):747-753.
- Dodic M, May CN, Wintour EM, Coghlan JP. 1998. An early prenatal exposure to excess glucocorticoid leads to hypertensive offspring in sheep. *Clin Sci (Lond)*, 94 (2):149-155.
- Doyle LW, Ford GW, Davis NM, Callanan C. 2000. Antenatal corticosteroid therapy and blood pressure at 14 years of age in preterm children. *Clin Sci (Lond)*, 98 (2):137-142.
- Dugovic C, Maccari S, Weibel L, Turek FW, Van Reeth O. 1999. High corticosterone levels in prenatally stressed rats predict persistent paradoxical sleep alterations. *J Neurosci*, 19 (19):8656-8664.
- Eisenach JC, Mandell G, Dewan DM. 1991. Maternal and fetal effects of labetalol in pregnant ewes. *Anesthesiology*, 74 (2):292-297.
- Erkinaro T, Kavasmaa T, Ylikauma L, Makikallio K, Haapsamo M, Acharya G, Ohtonen P, Alahuhta S, Rasanen J. 2009. Placental and fetal hemodynamics after labetalol or pindolol in a sheep model of increased placental vascular resistance and maternal hypertension. *Reprod Sci*, 16 (8):749-757.
- Evans MJ, Brett JT, McIntosh RP, McIntosh JE, Roud HK, Livesey JH, Donald RA. 1985. The effect of various corticotropin-releasing factor trains on the release of adrenocorticotropin, beta-endorphin, and beta-lipotropin from perfused ovine pituitary cells. *Endocrinology*, 117 (3):893-899.
- Familar M, Smith AI, Smith R, Funder JW. 1989. Arginine vasopressin is a much more potent stimulus to ACTH release from ovine anterior pituitary cells than ovine corticotropin-releasing factor. 1. In vitro studies. *Neuroendocrinology*, 50 (2):152-157.
- Feldman RL, Prida XE, Lambert CR, Hill JA. 1988. Systemic and coronary hemodynamics of labetalol in normotensive patients with ischemic heart disease. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2 (3):355-361.
- Ferrero S, Esposito F, Pretta S, Ragni N. 2006. Fetal risks related to the treatment of multiple sclerosis during pregnancy and breastfeeding. *Expert Rev Neurother*, 6 (12):1823-1831.
- Field T, Diego M, Hernandez-Reif M. 2006. Prenatal depression effects on the fetus and newborn: a review. *Infant Behav Dev*, 29 (3):445-455.

- Field T, Diego M, Hernandez-Reif M, Vera Y, Gil K, Schanberg S, Kuhn C, Gonzalez-Garcia A. 2004. Prenatal maternal biochemistry predicts neonatal biochemistry. *Int J Neurosci*, 114 (8):933-945.
- Ford SP. 1995. Control of blood flow to the gravid uterus of domestic livestock species. *J Anim Sci*, 73 (6):1852-1860.
- Fowden AL, Mijovic J, Silver M. 1993. The effects of cortisol on hepatic and renal gluconeogenic enzyme activities in the sheep fetus during late gestation. *J Endocrinol*, 137 (2):213-222.
- Fowden AL, Li J, Forhead AJ. 1998. Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance? *Proc Nutr Soc*, 57 (1):113-122.
- Frasch MG, Muller T, Wicher C, Weiss C, Lohle M, Schwab K, Schubert H, Nathanielsz PW, Witte OW, Schwab M. 2007. Fetal body weight and the development of the control of the cardiovascular system in fetal sheep. *J Physiol*, 579 (Pt 3):893-907.
- French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP. 1999. Repeated antenatal corticosteroids: size at birth and subsequent development. *Am J Obstet Gynecol*, 180 (1 Pt 1):114-121.
- French NP, Hagan R, Evans SF, Mullan A, Newnham JP. 2004. Repeated antenatal corticosteroids: effects on cerebral palsy and childhood behavior. *Am J Obstet Gynecol*, 190 (3):588-595.
- Friedman JE, Yun JS, Patel YM, McGrane MM, Hanson RW. 1993. Glucocorticoids regulate the induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription during diabetes. *J Biol Chem*, 268 (17):12952-12957.
- Frim DM, Emanuel RL, Robinson BG, Smas CM, Adler GK, Majzoub JA. 1988. Characterization and gestational regulation of corticotropin-releasing hormone messenger RNA in human placenta. *J Clin Invest*, 82 (1):287-292.
- Frye CA, Wawrzycki J. 2003. Effect of prenatal stress and gonadal hormone condition on depressive behaviors of female and male rats. *Horm Behav*, 44 (4):319-326.
- Giannakouloupoulos X, Teixeira J, Fisk N, Glover V. 1999. Human fetal and maternal noradrenaline responses to invasive procedures. *Pediatr Res*, 45 (4 Pt 1):494-499.
- Giannakouloupoulos X, Sepulveda W, Kourtis P, Glover V, Fisk NM. 1994. Fetal plasma cortisol and beta-endorphin response to intrauterine needling. *Lancet*, 344 (8915):77-81.
- Gicquel C, Le Bouc Y. 2006. Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res*, 65 Suppl 3:28-33.
- Gicquel C, El-Osta A, Le Bouc Y. 2008. Epigenetic regulation and fetal programming. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 22 (1):1-16.
- Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ. 1982. Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature*, 299 (5881):355-357.
- Gluckman PD. 1995. Clinical review 68: The endocrine regulation of fetal growth in late gestation: the role of insulin-like growth factors. *J Clin Endocrinol Metab*, 80 (4):1047-1050.
- Goland RS, Wardlaw SL, Stark RI, Brown LS, Jr., Frantz AG. 1986. High levels of corticotropin-releasing hormone immunoactivity in maternal and fetal plasma during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 63 (5):1199-1203.
- Gournay VA, Roman C, Rudolph AM. 1999. Effect of beta-adrenergic stimulation on oxygen metabolism in the fetal lamb. *Pediatr Res*, 45 (3):432-436.
- Groh T. 2009. Zur Entstehung der Schlafstadien und ihrer chronischen Beeinflussung durch eine pränatale Glukokortikoidbehandlung zur Förderung der Lungenreifung. Jena, Univ, Diss.
- Gu W, Jones CT. 1986. The effect of elevation of maternal plasma catecholamines on the fetus and placenta of the pregnant sheep. *J Dev Physiol*, 8 (3):173-186.
- Gu W, Jones CT, Parer JT. 1985. Metabolic and cardiovascular effects on fetal sheep of sustained reduction of uterine blood flow. *J Physiol*, 368:109-129.
- Gyevai A. 1980. Fine structure of, and ACTH production by, human fetal pituitaries taken at different periods of gestation. An in vitro study. *Acta Biol Acad Sci Hung*, 31 (1-3):107-120.
- Hargrave BY, Rose JC. 1986. By 95 days of gestation CRF increases plasma ACTH and cortisol in ovine fetuses. *Am J Physiol*, 250 (4 Pt 1):E422-427.
- Harris A, Seckl J. 2011. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm Behav*, 59 (3):279-289.



- Hirvikoski T, Nordenstrom A, Lindholm T, Lindblad F, Ritzen EM, Lajic S. 2008. Long-term follow-up of prenatally treated children at risk for congenital adrenal hyperplasia: does dexamethasone cause behavioural problems? *Eur J Endocrinol*, 159 (3):309-316.
- Ho H, Lhotak S, Solano ME, Karimi K, Pincus MK, Austin RC, Arck P. 2013. Prenatal stress enhances severity of atherosclerosis in the adult apolipoprotein E-deficient mouse offspring via inflammatory pathways. *J Dev Orig Health Dis*, 4 (1):90-97.
- Huttunen MO, Niskanen P. 1978. Prenatal loss of father and psychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry*, 35 (4):429-431.
- Igosheva N, Klimova O, Anishchenko T, Glover V. 2004. Prenatal stress alters cardiovascular responses in adult rats. *J Physiol*, 557 (Pt 1):273-285.
- Ishiwata H, Shiga T, Okado N. 2005. Selective serotonin reuptake inhibitor treatment of early postnatal mice reverses their prenatal stress-induced brain dysfunction. *Neuroscience*, 133 (4):893-901.
- Jones CT, Robinson RO. 1975. Plasma catecholamines in foetal and adult sheep. *J Physiol*, 248 (1):15-33.
- Jones CT, Ritchie JW. 1978. The metabolic and endocrine effects of circulating catecholamines in fetal sheep. *J Physiol*, 285:395-408.
- Jones CT, Gu W, Parer JT. 1989. Production of corticotrophin releasing hormone by the sheep placenta in vivo. *J Dev Physiol*, 11 (2):97-101.
- Jones CT, Roebuck MM, Walker DW, Johnston BM. 1988. The role of the adrenal medulla and peripheral sympathetic nerves in the physiological responses of the fetal sheep to hypoxia. *J Dev Physiol*, 10 (1):17-36.
- Jones SA, Challis JR. 1990. Steroid, corticotrophin-releasing hormone, ACTH and prostaglandin interactions in the amnion and placenta of early pregnancy in man. *J Endocrinol*, 125 (1):153-159.
- Kapoor A, Petropoulos S, Matthews SG. 2008. Fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. *Brain Res Rev*, 57 (2):586-595.
- Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG. 2006. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J Physiol*, 572 (Pt 1):31-44.
- Keller-Wood M, Wood CE. 1991a. Corticotropin-releasing factor in the ovine fetus and pregnant ewe: role of placenta. *Am J Physiol*, 261 (4 Pt 2):R995-1002.
- Keller-Wood M, Wood CE. 1991b. Does the ovine placenta secrete ACTH under normoxic or hypoxic conditions? *Am J Physiol*, 260 (2 Pt 2):R389-395.
- Keller-Wood M, Powers MJ, Gersting JA, Ali N, Wood CE. 2006. Genomic analysis of neuroendocrine development of fetal brain-pituitary-adrenal axis in late gestation. *Physiol Genomics*, 24 (3):218-224.
- Khashan AS, Abel KM, McNamee R, Pedersen MG, Webb RT, Baker PN, Kenny LC, Mortensen PB. 2008. Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Arch Gen Psychiatry*, 65 (2):146-152.
- Kirkpatrick SE, Pitlick PT, Hirschklau MJ, Friedman WF. 1976. Acute effects of maternal ethanol infusion on fetal cardiac performance. *Am J Obstet Gynecol*, 126 (8):1034-1037.
- Koenen SV, Mecenas CA, Smith GS, Jenkins S, Nathanielsz PW. 2002. Effects of maternal betamethasone administration on fetal and maternal blood pressure and heart rate in the baboon at 0.7 of gestation. *Am J Obstet Gynecol*, 186 (4):812-817.
- Kofman O. 2002. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, 26 (4):457-470.
- Krieger DT. 1982. Placenta as a source of 'brain' and 'pituitary' hormones. *Biol Reprod*, 26 (1):55-71.
- Kusaka M, Ui M. 1977. Activation of the Cori cycle by epinephrine. *Am J Physiol*, 232 (2):E145-155.
- Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. 2009. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev*, 89 (2):535-606.
- Lang U, Baker RS, Braems G, Zygmunt M, Kunzel W, Clark KE. 2003. Uterine blood flow--a determinant of fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 110 Suppl 1:S55-61.

- Laplante DP, Barr RG, Brunet A, Galbaud du Fort G, Meaney ML, Saucier JF, Zelazo PR, King S. 2004. Stress during pregnancy affects general intellectual and language functioning in human toddlers. *Pediatr Res*, 56 (3):400-410.
- Lazarus RS. 1991. Oxford Univ. Press.
- Lazarus RS. 1999. Free Assoc. Books.
- Lesage J, Del-Favero F, Leonhardt M, Louvart H, Maccari S, Vieau D, Darnaudery M. 2004. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *J Endocrinol*, 181 (2):291-296.
- Levidiotis M, Oldfield B, Wintour EM. 1987. Corticotrophin-releasing factor and arginine vasopressin fibre projections to the median eminence of fetal sheep. *Neuroendocrinology*, 46 (5):453-456.
- Liggins GC. 1969. Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J Endocrinol*, 45 (4):515-523.
- Lindsay RS, Lindsay RM, Waddell BJ, Seckl JR. 1996a. Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia*, 39 (11):1299-1305.
- Lindsay RS, Lindsay RM, Edwards CR, Seckl JR. 1996b. Inhibition of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring. *Hypertension*, 27 (6):1200-1204.
- Liotta A, Osathanondh R, Ryan KJ, Krieger DT. 1977. Presence of corticotropin in human placenta: demonstration of in vitro synthesis. *Endocrinology*, 101 (5):1552-1558.
- Luo JM, Murphy LJ. 1989. Dexamethasone inhibits growth hormone induction of insulin-like growth factor-I (IGF-I) messenger ribonucleic acid (mRNA) in hypophysectomized rats and reduces IGF-I mRNA abundance in the intact rat. *Endocrinology*, 125 (1):165-171.
- Maccari S, Piazza PV, Kabbaj M, Barbazanges A, Simon H, Le Moal M. 1995. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J Neurosci*, 15 (1 Pt 1):110-116.
- MacCarthy EP, Bloomfield SS. 1983. Labetalol: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, clinical uses and adverse effects. *Pharmacotherapy*, 3 (4):193-219.
- Macnaughton MC, Taylor T, McNally EM, Coutts JR. 1977. The effect of synthetic ACTH on the metabolism of [4-14C]-progesterone by the previable human fetus. *J Steroid Biochem*, 8 (5):499-504.
- Magness RR, Rosenfeld CR. 1986. Systemic and uterine responses to alpha-adrenergic stimulation in pregnant and nonpregnant ewes. *Am J Obstet Gynecol*, 155 (4):897-904.
- Mairesse J, Lesage J, Breton C, Breant B, Hahn T, Darnaudery M, Dickson SL, Seckl J, Blondeau B, Vieau D, Maccari S, Viltart O. 2007. Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292 (6):E1526-1533.
- Martensson L, Carter AM. 1982. Effect of noradrenaline on circulation in the genital tract of early and late pregnant guinea-pigs. *J Reprod Fertil*, 66 (1):23-29.
- Meaney MJ, Szyf M. 2005. Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialogues Clin Neurosci*, 7 (2):103-123.
- Meschia G. 1985. Safety margin of fetal oxygenation. *J Reprod Med*, 30 (4):308-311.
- Mesiano S, Jaffe RB. 1997. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev*, 18 (3):378-403.
- Metcalfe J, Parer JT. 1966. Cardiovascular changes during pregnancy in ewes. *Am J Physiol*, 210 (4):821-825.
- Midgley PC, Russell K, Oates N, Holownia P, Shaw JC, Honour JW. 1998. Adrenal function in preterm infants: ACTH may not be the sole regulator of the fetal zone. *Pediatr Res*, 44 (6):887-893.
- Mohan R, Irion G, Siddiqi T, Clark K. 1990. Maternal and Fetal Cardiovascular-Responses of the Normotensive and Hypertensive Pregnant Sheep to Parenteral Labetalol. *Clin Exp Hypertens* b9:293-309.

- Molnar J, Nijland MJ, Howe DC, Nathanielsz PW. 2002. Evidence for microvascular dysfunction after prenatal dexamethasone at 0.7, 0.75, and 0.8 gestation in sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283 (3):R561-567.
- Molnar J, Howe DC, Nijland MJ, Nathanielsz PW. 2003. Prenatal dexamethasone leads to both endothelial dysfunction and vasodilatory compensation in sheep. *J Physiol*, 547 (Pt 1):61-66.
- Moritz KM, Johnson K, Douglas-Denton R, Wintour EM, Dodic M. 2002. Maternal glucocorticoid treatment programs alterations in the renin-angiotensin system of the ovine fetal kidney. *Endocrinology*, 143 (11):4455-4463.
- Moss TJ, Sloboda DM, Gurrin LC, Harding R, Challis JR, Newnham JP. 2001. Programming effects in sheep of prenatal growth restriction and glucocorticoid exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281 (3):R960-970.
- Moss TJ, Doherty DA, Nitsos I, Sloboda DM, Harding R, Newnham JP. 2005. Effects into adulthood of single or repeated antenatal corticosteroids in sheep. *Am J Obstet Gynecol*, 192 (1):146-152.
- Mulder EJ, Robles de Medina PG, Huizink AC, Van den Bergh BR, Buitelaar JK, Visser GH. 2002. Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child. *Early Hum Dev*, 70 (1-2):3-14.
- Muller T, Lohle M, Schubert H, Bauer R, Wicher C, Antonow-Schlorke I, Sliwka U, Nathanielsz PW, Schwab M. 2002. Developmental changes in cerebral autoregulatory capacity in the fetal sheep parietal cortex. *J Physiol*, 539 (Pt 3):957-967.
- Murphy BE. 1973. Steroid arteriovenous differences in umbilical cord plasma: evidence of cortisol production by the human fetus in early gestation. *J Clin Endocrinol Metab*, 36 (5):1037-1038.
- Neuman TS, Spragg RG, Wagner PD, Moser KM. 1980. Cardiopulmonary consequences of decompression stress. *Respir Physiol*, 41 (2):143-153.
- Newnham JP, Polk DH, Kelly RW, Padbury JF, Evans SF, Ikegami M, Jobe AH. 1994. Catecholamine response to ultrasonographically guided percutaneous blood sampling in fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol*, 171 (2):460-465.
- Ngan Kee WD, Khaw KS, Tan PE, Ng FF, Karmakar MK. 2009. Placental transfer and fetal metabolic effects of phenylephrine and ephedrine during spinal anesthesia for cesarean delivery. *Anesthesiology*, 111 (3):506-512.
- Niederhofer H, Reiter A. 2004. Prenatal maternal stress, prenatal fetal movements and perinatal temperament factors influence behavior and school marks at the age of 6 years. *Fetal Diagn Ther*, 19 (2):160-162.
- Niezgoda J, Bobek S, Wronska-Fortuna D, Wierzchos E. 1993. Response of sympatho-adrenal axis and adrenal cortex to short-term restraint stress in sheep. *Zentralbl Veterinarmed A*, 40 (8):631-638.
- Noorlander CW, De Graan PN, Middeldorp J, Van Beers JJ, Visser GH. 2006. Ontogeny of hippocampal corticosteroid receptors: effects of antenatal glucocorticoids in human and mouse. *J Comp Neurol*, 499 (6):924-932.
- Norman LJ, Lye SJ, Wlodek ME, Challis JR. 1985. Changes in pituitary responses to synthetic ovine corticotrophin releasing factor in fetal sheep. *Can J Physiol Pharmacol*, 63 (11):1398-1403.
- Nuwayhid B, Brinkman CR, Katchen B, Symchowicz S, Martinek H, Assali NS. 1975. Maternal and fetal hemodynamic effects of diazoxide. *Obstet Gynecol*, 46 (2):197-203.
- Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR. 1998. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest*, 101 (10):2174-2181.
- O'Regan D, Kenyon CJ, Seckl JR, Holmes MC. 2008. Prenatal dexamethasone 'programmes' hypotension, but stress-induced hypertension in adult offspring. *J Endocrinol*, 196 (2):343-352.
- Oakes GK, Ehrenkranz RA, Walker AM, McLaughlin MK, Brennan SC, Chez RA. 1980. Effect of alpha-adrenergic agonist and antagonist infusion on the umbilical and uterine circulations of pregnant sheep. *Biol Neonate*, 38 (5-6):229-237.

- Okamoto E, Takagi T, Azuma C, Kimura T, Tokugawa Y, Mitsuda N, Saji F, Tanizawa O. 1990. Expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene in human placenta and amniotic membrane. *Horm Metab Res*, 22 (7):394-397.
- Ortiz LA, Quan A, Weinberg A, Baum M. 2001. Effect of prenatal dexamethasone on rat renal development. *Kidney Int*, 59 (5):1663-1669.
- Painter RC, Roseboom TJ, de Rooij SR. 2012. Long-term effects of prenatal stress and glucocorticoid exposure. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 96 (4):315-324.
- Papadimitriou A, Priftis KN. 2009. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation*, 16 (5):265-271.
- Parrott RF, Misson BH, de la Riva CF. 1994. Differential stressor effects on the concentrations of cortisol, prolactin and catecholamines in the blood of sheep. *Res Vet Sci*, 56 (2):234-239.
- Partsch CJ, Sippell WG, MacKenzie IZ, Aynsley-Green A. 1991. The steroid hormonal milieu of the undisturbed human fetus and mother at 16-20 weeks gestation. *J Clin Endocrinol Metab*, 73 (5):969-974.
- Petraglia F, Florio P, Nappi C, Genazzani AR. 1996. Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocr Rev*, 17 (2):156-186.
- Phillippe M. 1983. Fetal catecholamines. *Am J Obstet Gynecol*, 146 (7):840-855.
- Phocas I, Sarandakou A, Rizos D. 1990. Maternal serum total cortisol levels in normal and pathologic pregnancies. *Int J Gynaecol Obstet*, 31 (1):3-8.
- Polyakov A, Cohen S, Baum M, Trickey D, Jolley D, Wallace EM. 2007. Patterns of antenatal corticosteroid prescribing 1998-2004. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 47 (1):42-45.
- Price WA, Stiles AD, Moats-Staats BM, D'Ercole AJ. 1992. Gene expression of insulin-like growth factors (IGFs), the type 1 IGF receptor, and IGF-binding proteins in dexamethasone-induced fetal growth retardation. *Endocrinology*, 130 (3):1424-1432.
- Rakers F. 2010. Der Einfluss von chronischem Stress während der Schwangerschaft auf die funktionelle Reifung des fetalen zentralen Nervensystems. Jena, Univ:Diss.
- Rakers F, Frauendorf V, Rupprecht S, Schiffner R, Bischoff SJ, Kiehntopf M, Reinhold P, Witte OW, Schubert H, Schwab M. 2013. Effects of early- and late-gestational maternal stress and synthetic glucocorticoid on development of the fetal hypothalamus-pituitary-adrenal axis in sheep. *Stress*, 16 (1):122-129.
- Resnik R, Brink GW, Wilkes M. 1979. Catecholamine-mediated reduction in uterine blood flow after nicotine infusion in the pregnant ewe. *J Clin Invest*, 63 (6):1133-1136.
- Rice GE, Wong MH, Hollingworth SA, Thorburn GD. 1990. Prostaglandin G/H synthase activity in ovine cotyledons: a gestational profile. *Eicosanoids*, 3 (4):231-236.
- Robinson BG, Emanuel RL, Frim DM, Majzoub JA. 1988. Glucocorticoid stimulates expression of corticotropin-releasing hormone gene in human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (14):5244-5248.
- Rose JC, Kute TE, Winkler L. 1985. Glucocorticoid receptors in sheep brain tissues during development. *Am J Physiol*, 249 (4 Pt 1):E345-349.
- Sanders M, Fazzi G, Janssen G, Blanco C, De Mey J. 2004. Prenatal stress changes rat arterial adrenergic reactivity in a regionally selective manner. *Eur J Pharmacol*, 488 (1-3):147-155.
- Sandman CA, Davis EP, Buss C, Glynn LM. 2011. Prenatal programming of human neurological function. *Int J Pept*, 2011:837596.
- Schreuder MF, Nauta J. 2007. Prenatal programming of nephron number and blood pressure. *Kidney Int*, 72 (3):265-268.
- Schwab M. 2009. Intrauterine programming of disorders of brain function in later life. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch*, 49 (1):13-28.
- Schwab M, Coksaygan T, Nathanielsz PW. 2006. Betamethasone effects on ovine uterine and umbilical placental perfusion at the dose used to enhance fetal lung maturation. *Am J Obstet Gynecol*, 194 (2):572-579.

- Schwab M, Coksaygan T, Rakers F, Nathanielsz PW. 2012. Glucocorticoid exposure of sheep at 0.7 to 0.75 gestation augments late-gestation fetal stress responses. *Am J Obstet Gynecol*, 206 (3):253 e216-222.
- Schwab M, Antonow-Schlorke I, Kuhn B, Muller T, Schubert H, Walter B, Sliwka U, Nathanielsz PW. 2001. Effect of antenatal betamethasone treatment on microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2 in fetal sheep. *J Physiol*, 530 (Pt 3):497-506.
- Schwab M, Heinemann S, Schwab K, Thoms I, Rupprecht S, Hoyer H, Ligges C, Hoyer D, Schleussner E. 2010. Effects of Prenatal Betamethasone (BM) Exposure on Cortical Activity at the Age of Eight Years-A Pilot Study. *Reproductive Sciences*, 17 (3):292A-293A.
- Seckl JR. 2004. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol*, 151 Suppl 3:U49-62.
- Seckl JR, Meaney MJ. 2006. Glucocorticoid "programming" and PTSD risk. *Ann N Y Acad Sci*, 1071:351-378.
- Segal S, Wang SY. 2008. The effect of maternal catecholamines on the caliber of gravid uterine microvessels. *Anesth Analg*, 106 (3):888-892, table of contents.
- Selye H. 1974. McClelland and Stewart Ltd.
- Seron-Ferre M, Lawrence CC, Siiteri PK, Jaffe RB. 1978. Steroid production by definitive and fetal zones of the human fetal adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab*, 47 (3):603-609.
- Shnider SM, Wright RG, Levinson G, Roizen MF, Wallis KL, Rolbin SH, Craft JB. 1979. Uterine blood flow and plasma norepinephrine changes during maternal stress in the pregnant ewe. *Anesthesiology*, 50 (6):524-527.
- Skillman CA, Plessinger MA, Woods JR, Clark KE. 1985. Effect of graded reductions in uteroplacental blood flow on the fetal lamb. *Am J Physiol*, 249 (6 Pt 2):H1098-1105.
- Sloboda DM, Newnham JP, Challis JR. 2000. Effects of repeated maternal betamethasone administration on growth and hypothalamic-pituitary-adrenal function of the ovine fetus at term. *J Endocrinol*, 165 (1):79-91.
- Sloboda DM, Moss TJ, Li S, Matthews SG, Challis JR, Newnham JP. 2008. Expression of glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptor, and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 in the fetal and postnatal ovine hippocampus: ontogeny and effects of prenatal glucocorticoid exposure. *J Endocrinol*, 197 (2):213-220.
- Speiser PW, New MI. 1994. Prenatal diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia. *Clin Perinatol*, 21 (3):631-645.
- Stutchfield PR, Whitaker R, Gliddon AE, Hobson L, Kotecha S, Doull IJ. 2013. Behavioural, educational and respiratory outcomes of antenatal betamethasone for term caesarean section (ASTECS trial). *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 98 (3):F195-200.
- Sugden MC, Langdown ML, Munns MJ, Holness MJ. 2001. Maternal glucocorticoid treatment modulates placental leptin and leptin receptor expression and materno-fetal leptin physiology during late pregnancy, and elicits hypertension associated with hyperleptinaemia in the early-growth-retarded adult offspring. *Eur J Endocrinol*, 145 (4):529-539.
- Svendsen CK. 1979. Effects of acute lactic acidosis on some hemodynamic and hematologic values in three cows. *Nord Vet Med*, 31 (12):497-507.
- Tangalakakis K, Lumbers ER, Moritz KM, Towstoles MK, Wintour EM. 1992. Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. *Exp Physiol*, 77 (5):709-717.
- Thorp JA, O'Connor M, Belden B, Etzenhouser J, Hoffman EL, Jones PG. 2003. Effects of phenobarbital and multiple-dose corticosteroids on developmental outcome at age 7 years. *Obstet Gynecol*, 101 (2):363-373.
- Tsuno N, Besset A, Ritchie K. 2005. Sleep and depression. *J Clin Psychiatry*, 66 (10):1254-1269.
- Vallee M, Mayo W, Maccari S, Le Moal M, Simon H. 1996. Long-term effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters: relationship to corticosterone secretion response. *Brain Res*, 712 (2):287-292.
- Van den Bergh BR, Marcoen A. 2004. High antenatal maternal anxiety is related to ADHD symptoms, externalizing problems, and anxiety in 8- and 9-year-olds. *Child Dev*, 75 (4):1085-1097.

- Van den Bergh BR, Mulder EJ, Mennes M, Glover V. 2005a. Antenatal maternal anxiety and stress and the neurobehavioural development of the fetus and child: links and possible mechanisms. A review. *Neurosci Biobehav Rev*, 29 (2):237-258.
- Van den Bergh BR, Van Calster B, Smits T, Van Huffel S, Lagae L. 2008. Antenatal maternal anxiety is related to HPA-axis dysregulation and self-reported depressive symptoms in adolescence: a prospective study on the fetal origins of depressed mood. *Neuropsychopharmacology*, 33 (3):536-545.
- Van den Bergh BR, Mennes M, Oosterlaan J, Stevens V, Stiers P, Marcoen A, Lagae L. 2005b. High antenatal maternal anxiety is related to impulsivity during performance on cognitive tasks in 14- and 15-year-olds. *Neurosci Biobehav Rev*, 29 (2):259-269.
- van Dijk AE, van Eijsden M, Stronks K, Gemke RJ, Vrijkotte TG. 2010. Cardio-metabolic risk in 5-year-old children prenatally exposed to maternal psychosocial stress: the ABCD study. *BMC Public Health*, 10:251.
- van Os J, Selten JP. 1998. Prenatal exposure to maternal stress and subsequent schizophrenia. The May 1940 invasion of The Netherlands. *Br J Psychiatry*, 172:324-326.
- van Zwieten PA. 1993. An overview of the pharmacodynamic properties and therapeutic potential of combined alpha- and beta-adrenoceptor antagonists. *Drugs*, 45 (4):509-517.
- van Zwieten PA. 1996. Modulation of sympathetic outflow by centrally acting antihypertensive drugs. *Cardiovasc Drugs Ther*, 10 Suppl 1:283-289.
- Waddell BJ, Burton PJ. 1993. Release of bioactive ACTH by perfused human placenta at early and late gestation. *J Endocrinol*, 136 (2):345-353.
- Walker AM, Cannata J, Dowling MH, Ritchie B, Maloney JE. 1978. Sympathetic and parasympathetic control of heart rate in unanaesthetized fetal and newborn lambs. *Biol Neonate*, 33 (3-4):135-143.
- Walker DW, Hale JR, Fawcett AA, Pratt NM. 1995. Cardiovascular responses to heat stress in late gestation fetal sheep. *Exp Physiol*, 80 (5):755-766.
- Wang Z, Goonewardene LA. 2004. The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. *Canadian Journal of Animal Science*, 84 (1):1-11.
- Watson JB, Mednick SA, Huttunen M, Wang X. 1999. Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. *Dev Psychopathol*, 11 (3):457-466.
- Weinstock M. 2008. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev*, 32 (6):1073-1086.
- Weiss C, Frasch MG, T M, H S, Schwab M. 2007. Development of cortical acoustic evoked potentials in fetal sheep – effects of betamethasone. *J Soc Gynecol Invest* 14:673.
- Welberg LA, Seckl JR. 2001. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol*, 13 (2):113-128.
- Welberg LA, Seckl JR, Holmes MC. 2000. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. *Eur J Neurosci*, 12 (3):1047-1054.
- Welberg LA, Seckl JR, Holmes MC. 2001. Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour. *Neuroscience*, 104 (1):71-79.
- Weston JA. 1970. The migration and differentiation of neural crest cells. *Adv Morphog*, 8:41-114.
- Wheeler AS, James FM, 3rd, Meis PJ, Rose JC, Fishburne JI, Dewan DM, Urban RB, Greiss FC, Jr. 1980. Effects of nitroglycerin and nitroprusside on the uterine vasculature of gravid ewes. *Anesthesiology*, 52 (5):390-394.
- Wintour EM, Moritz KM, Johnson K, Ricardo S, Samuel CS, Dodic M. 2003. Reduced nephron number in adult sheep, hypertensive as a result of prenatal glucocorticoid treatment. *J Physiol*, 549 (Pt 3):929-935.
- Wintour EM, Brown EH, Denton DA, Hardy KJ, McDougall JG, Oddie CJ, Whipp GT. 1975. The ontogeny and regulation of corticosteroid secretion by the ovine foetal adrenal. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 79 (2):301-316.

- Wood CE. 2005. Estrogen/hypothalamus-pituitary-adrenal axis interactions in the fetus: The interplay between placenta and fetal brain. *J Soc Gynecol Investig*, 12 (2):67-76.
- Wood CE, Keller-Wood M. 1991. Induction of parturition by cortisol: effects on negative feedback sensitivity and plasma CRF. *J Dev Physiol*, 16 (5):287-292.
- Wyrwoll CS, Holmes MC. 2012. Prenatal excess glucocorticoid exposure and adult affective disorders: a role for serotonergic and catecholamine pathways. *Neuroendocrinology*, 95 (1):47-55.
- Xiong F, Zhang L. 2013. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. *Front Neuroendocrinol*, 34 (1):27-46.
- Yang J, Han H, Cao J, Li L, Xu L. 2006. Prenatal stress modifies hippocampal synaptic plasticity and spatial learning in young rat offspring. *Hippocampus*, 16 (5):431-436.
- Yang K, Jones SA, Challis JR. 1990. Changes in glucocorticoid receptor number in the hypothalamus and pituitary of the sheep fetus with gestational age and after adrenocorticotropin treatment. *Endocrinology*, 126 (1):11-17.
- Yates DT, Macko AR, Chen X, Green AS, Kelly AC, Anderson MJ, Fowden AL, Limesand SW. 2012. Hypoxaemia-induced catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells inhibits glucose-stimulated hyperinsulinaemia in fetal sheep. *J Physiol*, 590 (Pt 21):5439-5447.
- Yelleswaram K, Rurak DW, Hall C, Wright MR, Axelson JE. 1992. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of labetalol in the pregnant sheep. *J Pharmacol Exp Ther*, 262 (2):683-691.
- Yelleswaram K, Rurak DW, Kwan E, Hall C, Doroudian A, Abbott FS, Axelson JE. 1993. Disposition, metabolism, and pharmacodynamics of labetalol in adult sheep. *Drug Metab Dispos*, 21 (2):284-292.
- Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM. 2006. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension*, 47 (3):502-508.

## Anhang

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Prof. Dr.med. M. Schwab
- Prof. Dr.med. P. Schlattmann
- Dr.med. F. Rakers
- Dr.med.vet. S. Bischoff

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 26.03.2015

Michelle Dreiling (geb. Haase)



**Tabellarischer Lebenslauf**

|   |  |
|---|--|
| <i>Name</i>                             | Michelle Dreiling (geb. Haase)   |
| <i>Geburtsdatum</i>                     | 15.12.1989   |
| <i>Geburtsort</i>                       | Karl-Marx-Stadt  |
| <i>Schulbildung</i>                     | 1996-2000: Rudolf-Hennig-Grundschule Brünlos<br>2000-2008: Matthes-Enderlein-Gymnasium Zwönitz<br>allgemeine Hochschulreife im Juli 2008 |
| <i>Studium</i>                          | 10/2008-10/2014: Studium der Humanmedizin an der<br>Friedrich-Schiller-Universität Jena  |
| <i>Wissenschaftliche Präsentationen</i> | 11/2013: Posterpräsentation auf dem „8 <sup>th</sup> World Congress<br>on Developmental Origins of Health and Disease“ in<br>Singapur    |
| <i>Berufliche Tätigkeiten</i>           | seit 01/2015: Assistenzärztin, Hans-Berger-Klinik für<br>Neurologie, Universitätsklinikum Jena   |

## **Danksagung**

Mein ausdrücklicher Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr.med. M. Schwab nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern auch für die geduldige und stets motivierte fachliche und menschliche Begleitung.

Ebenso danke ich Herrn Dr.med. F. Rakers für die außerordentlich hilfreiche Unterstützung zu jeder Zeit, sowie die produktive und lehrreiche Zusammenarbeit

Weiterhin möchte ich mich beim gesamten Team des Instituts für Versuchstierkunde unter der Leitung von Herrn Dr. Harald Schubert für die Durchführung der zahlreichen Versuche bedanken.

Zudem danke ich Herrn Prof. Dr.med. P. Schlattmann für die ausführliche statistische Beratung.

Ich danke meinen Eltern, welche mich stets unterstützt und vor allem in der arbeitsintensiven Zeit Rücksicht genommen haben.

Ein besonderer Dank gilt Johannes, der mir insbesondere in der finalen Phase sehr hilfreich zur Seite stand.